

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Fyziologie živočichů



**Bc. Kristýna Skuhrová**

**Vliv inkubační teploty na růst pracovního a převodního myokardu  
u kuřecího embrya**

**Effect of incubation temperature on growth of the working and conducting  
myocardium in the embryonic chick**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Prof. MUDr. David Sedmera, DSc.

Praha 2018

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně citovala a uvedla všechny použité informační zdroje. Současně prohlašuji, že tato práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze

Kristýna Skuhrová

Podpis

## **Poděkování**

Nejprve bych chtěla velmi poděkovat svému školiteli panu prof. Davidu Sedmerovi za jeho neuvěřitelnou trpělivost a ochotu při vedení mé diplomové práce. Velice mu děkuji za možnost se na něho obrátit v každém případě, za vstřícnost, za podporu i včetně studijních záležitostí a pomoc při sepisování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Aleně Kvasilové za odborné vedení v praktické části diplomové práce, při sestavování protokolů a jejich následné úpravy, také za ochotu věnovat se korektuře diplomové práce. Za pečlivou kontrolu a péči o vejce v počátcích experimentu bych ráda poděkovala Jarmile Svatůňkové. Dále bych chtěla poděkovat Marii Jindrákové, Mgr. Kláře Krausové a Dr. Veronice Olejníčkové za pomoc s postupy a orientací v laboratoři či při práci s mikroskopem, a také za jejich podporu. Také děkuji Anatomickému ústavu 1. lékařské fakulty a Fyziologickému ústavu AV ČR, díky nimž mi bylo umožněno tuto práci vytvořit. Na závěr si největší poděkování zaslouží moje rodina, která mě vždy trpělivě podporovala, ochotně pomáhala, když to bylo možné a vytvořili mi skvělé zázemí, bez kterého by to nešlo tak hladce. Děkuji mým rodičům, Terce a Fandovi, babičce, ale také přátelům a hlavně Jirkovi, kteří to se mnou vydrželi a vždy mě podpořili.

## **Grantová podpora**

Diplomová práce vznikla za podpory grantu GA ČR 16-02972S

## Abstrakt

Před téměř 50 lety bylo ukázáno, že vlivem hypotermní inkubace u kuřat dochází k celkovému zmenšení embryí a zároveň zvětšení srdce, jež bylo připisováno hypertrofii (zvětšenému objemu buněk). Oplozená kuřecí vejce byla inkubována v normotermii (37,5°C) a hypotermii (33,5°C) od jedenáctého embryonálního dne. Sedmnáctý den byla embrya zvážena a poté byla zvážena i jejich srdce. V souladu s předchozími výsledky byla hypotermní embrya o 29% menší a měla srdce o 18% větší. Poměr hmotností srdce a těla byl u hypotermní skupiny o 67% vyšší. Naměřená velikost buněk byla v cílových oblastech velmi vyrovnaná a to i mezi oběma skupinami. Tloušťka stěny levé komory byla dvojnásobná oproti pravé komoře a u hypotermního modelu byla nesignifikantně vyšší. Terminální část převodního systému, Purkyňova vlákna, byla menší než pracovní kardiomyocyty. U hypotermie byla Purkyňova vlákna mírně zvětšena. Proliferační aktivita byla měřena pomocí imunohistochemického značení anti-phosphohiston H3. U experimentální skupiny byla znatelně vyšší proliferace, v pravé komoře dosáhla statistické významnosti. V mechanismu růstu embryonálního srdce při hypotermní inkubaci převažuje tedy hyperplazie (zvětšená proliferace buněk) nad hypertrofií.

**Klíčová slova:** kuřecí embryo, hypotermie, inkubace, hypertrofie, hyperplazie, kardiomyocyty, převodní systém srdeční

## **Abstract**

It was shown almost 50 years ago that hypothermic incubation of chicken embryos results in a reduction in the size of embryos and an increase in the heart weight, presumably by hypertrophy (increase in cell volume). The chicken embryos were incubated in normothermia (37.5 ° C) and hypothermia (33.5 ° C) from the eleventh embryonic day. On the 17th day, the embryos were weighed and then their hearts were weighed. In agreement with the previous results, hypothermic embryos were 29% smaller and their hearts 18% heavier. The heart-to-body weight ratio was 67% higher in the hypothermic group. The measured cell size was very similar in the target areas and it was also between the two groups. The left ventricle width was twofold that the right one and the difference was not significantly higher in the hypothermia model. Purkinje fibers, the terminal part of the conduction system, were smaller than the working cardiomyocytes. Purkinje fibers were slightly enlarged after hypothermic incubation. The proliferation rate was measured by immunohistochemical labeling of anti-phospho histone H3. The experimental group showed much higher proliferation rate; it reached statistical significance in the right ventricle. Thus, hypothermic incubation resulted in increased growth of embryonic heart based on hyperplasia (increase in cell proliferation) rather than hypertrophy.

**Key words:** chick embryo, hypothermia, incubation, hypertrophy, hyperplasia, cardiomyocytes, cardiac conduction system

# Obsah

<b>Prohlášení:</b> .....	<b>2</b>
<b>Poděkování</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstrakt</b> .....	<b>4</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>9</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>10</b>
<b>2 Přehled literatury</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1 Funkční anatomie srdce</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2 Převodní systém srdeční</b> .....	<b>11</b>
2.2.1 Uspořádání převodního systému srdečního .....	12
2.2.2 Purkyňova vlákna .....	14
2.2.2.1 Intramurální a subendokardiální Purkyňova vlákna .....	15
<b>2.3 Akční potenciál – vznik a šíření srdečním svalem</b> .....	<b>16</b>
<b>2.4 Vývoj převodního systému</b> .....	<b>17</b>
2.4.1 Kardiogeneze .....	17
2.4.2 Počáteční vývoj kuřecího srdce .....	18
2.4.3 Role srdečních polí v srdci .....	19
2.4.4 Vývoj převodního systému - srovnání kuřecího a myšího modelu .....	20
2.4.4.1 Postnatální vývoj převodního systému .....	22
<b>2.5 Propojení srdečních buněk</b> .....	<b>23</b>
2.5.1 Gap junction .....	24
2.5.1.1 Srdeční gap junctions.....	26
<b>2.6 Hypotermie</b> .....	<b>27</b>
2.6.1 Vliv hypotermie na organismus.....	29
2.6.2 Hypotermie v kardiovaskulárním systému .....	31
2.6.2.1 Vliv hypotermie na růst srdce.....	32
<b>3 Cíl práce</b> .....	<b>34</b>
<b>4 Experimentální část</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1 Metodika</b> .....	<b>35</b>
4.1.1 Pokusný model .....	35
4.1.2 Odběr embryí.....	35
4.1.3 Krájení bločků .....	36
4.1.4 Histologické značení.....	36
4.1.5 Imunohistochemická značení.....	37
4.1.6 Mikroskopické metody .....	38

4.1.7	Analýza snímků .....	40
4.1.8	Statistické vyhodnocení .....	40
<b>4.2</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>41</b>
4.2.1	Hmotnost těla a srdce .....	41
4.2.2	Šíře kardiomyocytů ve vybraných oblastech .....	43
4.2.3	Šíře stěny komor .....	48
4.2.4	Příčný průměr Purkyňových vláken .....	50
4.2.5	Proliferace v kardiomyocytech .....	51
<b>5</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>56</b>
5.1	Hypotermický kuřecí model .....	56
5.2	Korelace mezi velikostí buněk, hmotností srdce a těla .....	57
5.3	Regionální rozdíly v srdečních oddílech .....	58
5.4	Reakce embryonálního srdce na změny hemodynamiky .....	59
5.5	Změny v převodním systému .....	61
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Přehled literatury .....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>75</b>

## Seznam: Obrázky, Grafy

Obrázek 1: Organizace převodního systému srdečního. ....	12
Obrázek 2: Schematický popis exprese transkripčních faktorů <i>Irx4</i> a <i>Tbx5</i> během počáteční srdeční specifikace dutin. ....	18
Obrázek 3: Morfologie komor v obraze rastrovacího elektronového mikroskopu. ....	19
Obrázek 4: Rozdělení dvou základních srdečních polí. ....	20
Obrázek 5: Způsoby propojení konexonů s možností variabilních konexinů. ....	25
Obrázek 6: Shrnutí typického rozložení konexinových kanálů v dospělém srdci savců. ....	26
Obrázek 7: Schematické znázornění poklesu teploty tělesného jádra a jeho základní reakce na organismus. ....	29
Obrázek 8: Elektrokardiogram u experimentálních skupin kuřat inkubovaných v odlišné teplotě. ....	33
Graf 1: Průměrná hmotnost těla kuřecích embryí u kontrolní skupiny (červeně) a u experimentální skupiny (modře) s inkubací v hypotermních podmínkách. ....	41
Graf 2: Průměrná váha srdce embryí u normotermní skupiny (červeně) a u hypotermní skupiny (modře). ..	42
Graf 3: Zprůměrované hodnoty měření šíře buněk u kontrol a experimentální skupiny po barvení hematoxylinem a eosinem. ....	43
Obrázek 11: Příklady obrázků z konfokálního fluorescenčního mikroskopu po značení $\alpha$ -SA a WGA. ....	44
Graf 4: Naměřené hodnoty šíře buněk u normotermicky a hypotermicky inkubované skupiny po imunohistochemickém značení. ....	45
Graf 5: Koeficient korelace mezi jednotlivými oblastmi. ....	46
Graf 6: Srovnání jednotlivých oblastí vůči hmotnosti srdce. ....	47
Graf 7: Naměřené hodnoty tloušťky stěny levé a pravé komory u normotermie a hypotermie. ....	48
Graf 8: Srovnání velikosti buněk proti šířce stěny komor. ....	49
Obrázek 12: Ukázka Purkyňových vláken v řezu. ....	50
Graf 9: Srovnání průměrné velikosti příčného průměru Purkyňových vláken a kardiomyocytů u normotermie a hypotermie. ....	50
Graf 10: Porovnání množství proliferujících buněk v $1\text{mm}^3$ tkáně u normotermie a u hypotermie. ....	51
Obrázek 13: Příklad snímků z konfokálního fluorescenčního mikroskopu po značení pHIS 3. ....	52
Graf 11: Korelace proliferace mezi jednotlivými oblastmi v srdci. ....	53
Graf 12: Vztah mezi počtem proliferujících buněk v $1\text{mm}^3$ tkáně a váhou srdce. ....	54
Graf 13: Korelace mezi proliferací cirkulární vrstvy komory a tloušťkou stěny komory. ....	55



## Seznam zkratek

**Bmp** - kostní morfogenetický protein  
(*bone morphogenetic protein*)

**BSA** - hovězí sérový albumin  
(*bovine serum albumin*)

**CASQ2** – kalsekvestrin srdečního svalu

**Cx** – konexin

**ED** – embryonální den

**EtOH** - etanol

**Fgf** – růstový faktor fibroblastu  
(*fibroblast growth factor*)

**HCN** – výměník, který se otevírá během  
hyperpolarizace či cyklickými  
nukleotidy

**HH** – Hamburgerovo a Hamiltonovo rozdělení  
vývoje kuřecího embrya na 46 stádií

**HRT2** – transkripční faktor, tlumí transkripční  
faktory komor

**IgG** – imunoglobulin G

**IgM** – imunoglobulin M

**INF- $\gamma$**  – interferon  $\gamma$

**IL-1** – interleukin-1

**IL-6** – interleukin-6

**Ils** – transkripční faktor srdečního vývoje

**Irx** – gen ovlivňující formaci embrya  
(*Iroquois homeobox*)

**LV circ** – cirkulární vrstva levé komory

**LV mp** – papilární svaly v levé komoře

**Mhc** – těžký myozinový řetězec  
(*myosin heavy chain*)

**MW** – mikrovlnná trouba

**NGS** – normální kozí sérum  
(*normal goat serum*)

**Nkx** – vývojový transkripční faktor (homeobox)

**PBS** – fosfátový pufr

**PBT** – fosfátový pufr s Tweenem

**pHIS3** – fosforylovaný histon H3

**RV circ** – cirkulární vrstva pravé komory

**RYR2** – ryanidový receptor 2 v srdečním  
svalu

**SCN5A** – membránový sodíkový kanál

**Tbx** – transkripční faktor zapojený do vývoje  
srdce

**TNF –  $\alpha$**  – faktor nádorové nekrózy  $\alpha$

**WGA** – lektin z pšeničných klíčků vázající se  
na buněčnou membránu  
(*wheat germ aglutinin*)

**Wnt** – protein součástí signální dráhy

# 1 Úvod

Srdce je klíčovým orgánem v těle, který svou vytrvalou pracovitostí zajišťuje naše hlavní životní funkce. Svou plnou funkci přebírá již v počátku embryonálního vývoje, i když v této fázi ještě není strukturně dovyvinuto. V současné době je však známo již mnoho nemocí či defektů obdivuhodného orgánu, které se objevují čím dál častěji vzhledem k zvyšujícímu se věku populace. Současně s těmito objevy je zde stále nezodpovězeno mnoho věcí. Mechanismus odpovědný za programování kardiovaskulárních onemocnění je velmi málo znám. Narušený intrauteriní růst je spojen s nárůstem rizika kardiovaskulárních nemocí. Hypertrofie srdeční tkáně je ukazatelem morbidity a mortality, může však vycházet již z vývojového období.

Kardiovaskulární systém je charakteristický svou výraznou plasticitou ke změnám prostředí, které se měnily nebo se změní během vývoje. U některých živočichů stále není vysvětleno mnoho mechanismů adaptace, ale u zvířat jako jsou obratlovci (*Vertebrata*), je prokazatelná reakce na narůstající zátěž. Srdce umí upravit i svou strukturu a to hlavně pomocí hyperplazie, hypertrofie, ale také díky apoptóze.

Předmětem této práce je charakterizace adaptace srdce na hypotermické podmínky během inkubace. Jako pokusný model bylo vybráno kuře (*Gallus gallus* f. *domestica*), u kterého je možné aplikovat hypotermii během embryonálního období snadno. Zároveň srdce kuřete má podobný vývoj jako srdce lidské nebo jiných savců (*Mammalia*). Inspirací pro tuto práci byla publikace z roku 1970, kde autor uvádí, že zbytnění srdce bylo způsobeno hypertrofickým růstem buněk.

## 2 Přehled literatury

### 2.1 Funkční anatomie srdce

Jedním z nejdůležitějších orgánů v těle obratlovců je srdce. Tento dutý svalový orgán se skládá ze čtyř dutin (dvě síně, dvě komory) u savců a ptáků (*Aves*). Jeho hlavní funkcí je pumpování krve do celého těla. Zajišťuje oběh krve ve dvou systémech, kterými jsou tělní a plicní oběh. Funkcí krve je přenos dýchacích plynů, živin, odpadních látek a také produktů metabolismu. Dále transportuje v těle hormony a minerály a napomáhá k udržení homeostázy. Efektivně může fungovat jen tehdy, pokud je dobře synchronizováno a dochází-li k pravidelnému střídání systoly a diastoly u síní a komor. Tuto funkci zajišťuje převodní systém srdeční. Stěna srdce se skládá z více vrstev: tenké vnitřní vrstvy endokardu a velmi silného myokardu – srdeční svaloviny. Srdce zcela obaluje pevný obal z vaziva – perikard.

### 2.2 Převodní systém srdeční

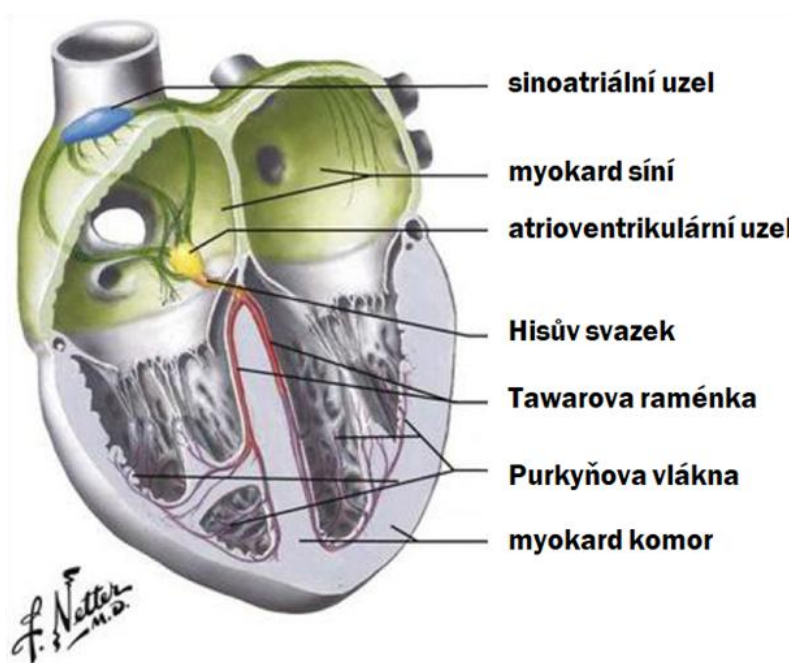
Jde o specializovaný systém buněk a tkání, který vytváří akční potenciál. Signál je poté veden do celého srdce převodním systémem. Buňky převodního systému předávají tento signál pracovním myocytům, ty podle toho pracují pravidelně a synchronizovaně. Díky této funkci se srdce stahuje jako jeden celek a vypuzení krve ze srdce je efektivním procesem. Jednotlivé části převodního systému jsou izolovány od kardiomyocytů pojivovou tkání až na konečnou část převodního systému – Purkyňova vlákna. Obecně má tento systém tři zásadní vlastnosti: rytmicitu, autonomii a automacii. Ptáci a savci jsou jedni z mála druhů, u kterých se převodní systém vyskytuje, u jiných druhů obratlovců či bezobratlých (*Invertebrata*) bývá vzácný (Jensen et al. 2013, Šolc 2007). Příkladem poikilothermního obratlovce, který má převodní systém srdeční, je vodní žába Drápatka vodní (*Xenopus laevis*) nebo drobná ryбка Danio pruhované (*Danio rerio*). U těchto dvou druhů byla nalezena aktivace apex-báze, jak je tomu právě u savců a ptáků. Tento fakt může potvrdit přítomnost speciální převodní dráhy využívané pro propagaci impulsu v srdci u poikilothermních obratlovců (Sedmera et al. 2003a).

Vývoj převodního systému je spojován s rozvojem regulace tělesné teploty. Homeotermové mají obecně vytvořen převodní systém. Naopak poikilothermové ho běžně nemívají, zatím není jisté, proč tomu tak je (Šolc 2007). U ptáků je struktura převodního systému shodná od embryonální fáze do dospělosti. U savců dochází ke změnám během vývoje (Sanders et al. 1986). Převodní systém nám i ostatním druhům nabízí nové možnosti, např. zrychlení životního stylu. Tento systém s sebou nese jisté riziko, kterým je např. srdeční arytmie. Srdeční arytmie patří mezi jednu ze závažných příčin mortality v rámci chorob kardiovaskulárního systému. Arytmie neboli poruchy rytmu

způsobené nesprávnou funkcí převodního systému mohou vznikat z mnoha příčin, jako jsou například: záněty, porucha renin-angiotenzin-aldosteron systému, poškození kardiomyocytů, vrozené defekty, poškození způsobené ischemiemi či následek farmakologické léčby (Bose et al. 2015, Bonow et al. 2012).

### 2.2.1 Uspořádání převodního systému srdečního

Celý systém se skládá z několika částí: sinoatriální uzel, atrioventrikulární uzel, Hisův svazek, Tawarova raménka a Purkyňova vlákna (Obr. 1). První zmínka o Purkyňových vláknech byla již v roce 1845, kdy je objevil Jan Evangelista Purkyně. Popsal je jako síť plochých želatinových vláken těsně pod membránou ve vnitřní stěně srdeční u ovcí (*Ovis*). Podobné buňky našel i u jiných zvířecích druhů např. prasete (*Sus*) a krávy (*Bos*), ale u lidí, králíka (*Oryctolagus*) a psa (*Canis*) se mu objevit nepodařilo. V té době dokonce ani neznal jejich funkci, jen spekuloval, zda jde o patologii či pouze pozůstatek z embryonálního období (Suma 2001). Až o padesát let později dokázal Sunao Tawara popsat správně jejich funkci a propojit jednotlivé části převodního systému dohromady (Tawara 1906).



**Obrázek 1: Organizace převodního systému srdečního.**

*Je složen z postupně na sebe navazujících částí. Převodní systém srdeční je složen z: sinoatriálního uzlu, atrioventrikulárního uzlu, Hisova svazku, pravého a levého Tawarova raménka a Purkyňových vláken. (upraveno dle [www.netterimages.com](http://www.netterimages.com)).*

Sinoatriální uzel obsahuje tři typy buněk: nodální myocyty, myocyty převodního typu a Purkyňova vlákna. Prvním druhem jsou nodální myocyty, které jsou brány za zdroj spontánní rytmicity. Jsou velmi tvarově proměnlivé, jsou bledé a obsahují málo buněčných organel. Dále se

tam vyskytují myocyty převodního typu, ty jsou na pomezí mezi nodálními myocyty a Purkyňovými vlákny. Předávají si vzruch mezi sebou, ale tyto buňky vedou akční potenciál velmi pomalu na rozdíl od ostatních dvou typů buněk. Ve srovnání s předchozím typem buněk jsou o něco málo menší a kratší. Poslední typ – Purkyňova vlákna umí vést impuls nejrychleji z kardiomyocytů. Jsou také o něco drobnější než nodální myocyty, neobsahují mnoho myofibril, zato mají hodně glykogenu a mitochondrií s dobře vyvinutým tubulárním systémem. Atrioventrikulární uzel a Hisův svazek obsahují pouze dva typy buněk, hluboko uložené nodální myocyty a periferní Purkyňova vlákna. Postupně kaudálním směrem začínají převažovat Purkyňova vlákna více než ostatní typy kardiomyocytů (Čihák 1997).

Prvotní impuls převodního systému vzniká v oblasti sinoatriálního uzlu (Keith – Flackův uzel). Z toho důvodu je tedy často nazýván udavač rytmu neboli hlavní pacemaker. Ve stěně je umístěn subendokardiálně v pravé síni přímo u vstupu horní duté žíly (Čihák 1997, Sedmera and Gourdie 2014, Davies 1942). Má protažený oválný tvar a je obklopen myokardem. Anatomicky je na něm možné popsat hlavu a ocas (Anderson et al. 1981). Tento zdroj srdeční automacie je umožněn díky speciálním iontovým kanálům, které se aktivují během hyperpolarizace nebo dále cyklickými nukleotidy (DiFrancesco 1993, DiFrancesco 2010).

Ze sinoatriálního uzlu signál pokračuje internodiálními spoji či preferenčními drahami do myokardu síně. Mezi tyto dráhy patří Jamesův svazek, Thorelův svazek a Wenckebachův svazek (Čihák 1997). Vzruch se dostává do atrioventrikulárního uzlu (Aschoff – Tawarův uzel) položeného sagitálně na přepážce mezi síněmi těsně pod endokardem (Davies 1942). V tomto místě dochází ke zpomalení rychlosti přenosu signálu ze síní do komor, což brání nejen přenosu síňových tachykardií na komory (Sedmera and Gourdie 2014), ale také to umožňuje naplnění komor krví (Čihák 1997, Trojan 2003). Při poškození sinoatriálního uzlu přebírá atrioventrikulární uzel funkci hlavního pacemakeru (Bakker et al. 2010).

Dále se vlna depolarizace šíří do atrioventrikulárního svazku, známého spíše jako Hisův svazek. Hisův svazek je obalen vrstvou vaziva, aby nedocházelo k zániku či ztlumení síly signálu (Sedmera and Gourdie 2014). Dále je rozdělen na dvě raménka: pravé a levé Tawarovo raménko (Čihák 1997). V mnoha ohledech jsou raménka velmi podobná Hisovu svazku, hlavně v rychlosti vedení signálu a v izolaci od okolních kardiomyocytů. U myši (*Mus*) a u lidí byla prokázána asymetrie mezi raménky, pravé Tawarovo raménko je velmi úzké a směrem k apexu se jen velmi málo větví. Oproti tomu levé Tawarovo raménko se větví hojně a je složeno z jemných větví. U pravého Tawarova raménka byla dokonce prokázána vyšší rychlost vedení než v levém Tawarově raménku (Miquerol et al. 2004, Tawara 1906).

Z větvení Tawarových ramének vzruch pokračuje do Purkyňových vláken. Tato vlákna zabíhají do myokardu, kde předávají signál pracovním myocytům k synchronizované kontrakci.

Zde se již vyskytuje pouze jeden typ buněk, kterými jsou Purkyňova vlákna (Čihák 1997). Existují dva typy Purkyňových vláken – subendokardiální a intramurální (vnitřní, transmurní či perivaskulární). U některých druhů jsou morfologicky odlišné subendokardiální Purkyňova vlákna od intramurálních. Tento druh vláken vede signál už od Tawarových ramének, mají na starost aktivaci komor od hrotu k bázi. Druhý typ intramurálních vláken se napojuje na subendokardiální. Překvapivě se tento typ nevyskytuje u všech druhů. Lidé a myši patří mezi druhy, které tato vlákna postrádají. Na druhou stranu je můžeme zajisté najít u kopytníků (*Ungulata*) a kuřat (Sedmera and Gourdie 2014, Oosthoek et al. 1993). Odlišnosti mezi těmito typy vláken popisuje jedna nedávná studie. Autor zde zmiňuje, že mezi typy vláken nejsou žádné větší odlišnosti, stejně tak i v architektuře, morfologii, velikosti a ani struktuře exprese konexinu 40 (Garcia-Bustos et al. 2017).

### 2.2.2 Purkyňova vlákna

Purkyňova vlákna se obecně od buněk pracovního myokardu velmi liší. Svou strukturní jednoduchostí spíše připomínají embryonální buňky. Tvar mají obvykle vřetenovitý, často dohromady tvoří provazce nebo shluky buněk. Tyto buňky obsahují málo myofibril, ale zato mnoho glykogenu a jsou tedy závislé na glykolytickém metabolismu (James 1967, Eichna and Dehaan 1961). Linie myofibril jsou propojené s tubuly sarkoplazmatického retikula. Ve většině studií bylo množství myofibril rovnoměrně rozložené. Zajímavostí je, že u koz a ovcí byl počet Purkyňových vláken nižší a byly lokalizovány převážně periferně (Sommer and Johnson 1968). Obvykle mají tato vlákna méně mitochondrií proti pracovním myocytům. Vynikají svou schopností vést signál velmi rychle a to až rychlostí 2-3 m/s (Eichna and Dehaan 1961). Podobně jako diferenciované kardiomyocyty mají jedno nebo dvě jádra, jádérko mají větší a chromatin není tolik kondenzovaný (Garcia-Bustos et al. 2017).

Tyto bledé buňky převodního systému formují přesně definovanou tkáň. Jsou oddělené funkčně, ale také anatomicky fibrózní vrstvou tkáně, které brání snížení impulsu mezi Purkyňovými vlákny. Je však zajímavé, že síť Purkyňových vláken je asymetrická v obou komorách (Sedmera and Gourdie 2014). Odlišují se i v celkové struktuře, v expresi iontových kanálů, kvalitě izolace, lokalizace větvení, cytoarchitektuře a ultrastruktuře buněk, a to jak individuálně, tak i mezidruhově (Garcia-Bustos et al. 2017, Sedmera and Gourdie 2014, Ono et al. 2009, Sommer and Johnson 1968). Odlišnost Purkyňových vláken a komorových myocytů nicméně není tak výrazná u králíků, morčat (*Cavia*) a koček (*Felis*). Naopak u koz (*Capra*), ovcí a psů není tak zřetelný rozdíl mezi oběma typy srdečních buněk. Purkyňova vlákna se odlišují menším počtem myofibril, umístěných spíše na periferii, rozptýleným sarkoplazmatickým retikulem a celkově menší velikostí buňky (Sommer and Johnson 1968). U některých druhů jsou buňky hustě nahromaděné, jako například

u kozy a ovce. Volněji se vyskytují u kočky, morčete a králíka, vlastně trochu i u psa (Sommer and Johnson 1968).

Charakterizace Purkyňových vláken není v literatuře vždy úplně jednotná. Jsou navrženy odlišné verze rozdělení Purkyňových vláken do skupin, ale často se rozcházejí už ve srovnání velikosti (Garcia-Bustos et al. 2017). Byly zkoumány morfologické rozdíly v Purkyňových vláknech pomocí světelné a elektronové mikroskopie a ty byly poté rozděleny do skupin. Purkyňova vlákna u potkanů, jako jedné z reprezentačních skupin, byla znatelně kratší, než je tomu u komorových myocytů. Obdobně tomu bylo i u makaků (*Macaca*). Situace u ostatních skupin kopytníků, koz a ovcí, a dále šelem, lidí, velryb, tuleňů (*Phocidae*) byla přesně opačná. Lze se domnívat, že situace u myši bude podobná jako potkanů (*Rattus*), že tedy Purkyňova vlákna budou menší než komorové myocyty (Ono et al. 2009).

V jiných studiích dochází k jiné kategorizaci skupin zkoumaných zvířat. Zde jde o rozdělení podle architektury Purkyňových vláken. Znovu se jedná o tři skupiny savců: první jsou hlodavci (*Rodentia*), do druhé patří opice (*Simiiformes*), lidé, kočky, psi a třetí jsou kopytníci a velryby (*Balaenidae*). Buňky kopytníků a velryb jsou zde charakterizovány jako velké a oválné. Zároveň u těchto druhů tvoří shluky v pružích po 2-8 buňkách, které jsou velmi rozptýlené a mají rychlé převodní vlastnosti. Skupina hlodavců se vykazuje výraznou podobností mezi Purkyňovými vlákny a kardiomyocyty, mají bohatou síťovitou strukturu a Purkyňova vlákna jsou větší než komorové myocyty. U opic, psů a koček je popisován větvenovitý tvar buněk Purkyňových vláken rozmístěných hlavně podél endokardu. Pouze u lidí mají Purkyňova vlákna více cylindrický tvar a jsou větší než pracovní kardiomyocyty (Garcia-Bustos et al. 2017, Canale et al. 2012). Ve studii na prasečích myocytech bylo zjištěno, že nejtenčí svazky se nacházejí v anteriorní oblasti, poté jsou septální, posteriorní a na konec laterální oblast srdce (Garcia-Bustos et al. 2017).

U prasat jsou Purkyňova vlákna značně větší než běžné myocyty, transversální průřez dosahuje 90  $\mu\text{m}$ , zatímco kardiomyocyty nepřesahují 20  $\mu\text{m}$ . Bledý vzhled při barvení hematoxylinem a eozinem či Masonovým trichromem je dán vysokým množstvím glykogenu v cytoplazmě a malým množstvím myofibril, které se objevují spíše v periférii a ne příliš organizované (Garcia-Bustos et al. 2017).

#### **2.2.2.1 Intramurální a subendokardiální Purkyňova vlákna**

Jak jsem již zmiňovala v předešlé kapitole, máme dva základní typy Purkyňových vláken – subendokardiální a intramurální či transmurální. Svazky vláken jsou distribuovány homogenně v subendokardiální oblasti, někdy i v perivaskulární jak bylo popsáno u ptáků (Gourdie et al. 1993b). Subendokardiální Purkyňova vlákna se obvykle propojují přes kontaktní neboli přechodné buňky. Tyto přechodné buňky jsou v kontaktu s první vrstvou pracovních myocytů, ale mohou je

doprovázet i do dalších vrstev (Garcia-Bustos et al. 2017). Intramurální Purkyňova vlákna postrádají lidé a myši, naopak jsou velmi hojná u kopytníků (Garcia-Bustos et al. 2017, Sedmera and Gourdie 2014, Oosthoek et al. 1993). Je zde velmi silné propojení mezi myocyty a Purkyňovými vlákny a dokonce může dojít k „úpravě“ architektury pracovních myocytů (Garcia-Bustos et al. 2017). Dle jedné studie na prasatech dochází téměř k okamžité aktivaci srdce (Meijborg et al. 2014), což může být velmi důležité v šíření signálu (Sedmera and Gourdie 2014, Ono et al. 2009). Celkově vlákna tvoří velmi hustou síť, která se objevuje skrz celou stěnu komory. Intramurální vlákna navazují na vlákna subendokardiální a obecně jsou terminální vlákna velmi roztroušená (Garcia-Bustos et al. 2017, Sedmera and Gourdie 2014). Byla demonstrována přítomnost silné kolagenové vrstvy obklopující Purkyňova vlákna. Na pokusných zvířatech byl nalezen tlustý fibrózní list. Funkční význam tohoto listu je elektrická izolace Purkyňových vláken od komorového svalu (Atkinson et al. 2011, Sedmera and Gourdie 2014). Funguje jako prevence před ztrátou a úbytkem převodní rychlosti na delší vzdálenosti (Ansari et al. 1999).

Hustota Purkyňových vláken se liší směrem od báze k apexu hlavně v septálním a anteriorním rozložení. Elektrický impuls se šíří skrz subendokardium, kde je hustota mnohem větší, než je u intramurálních vláken. Nicméně rozdíly v regionálních odlišnostech mezi zkoumanými zvířaty byly minimální. Tenčí vlákna byla nalezena hlavně v laterální oblasti až na posteriorní část srdečního apexu, kde je oblast distálních terminálních svazků Tawarových ramének. Subendokardiální Purkyňova vlákna jsou zcela izolována v apexu, u prasat jsou srdeční svazky obvykle pokryta vrstvou pojivové tkáně. Stoupající intramurální Purkyňova vlákna se větví a v terminální části mají odkrytá tato vlákna, což umožňuje rychlejší typickou aktivaci komor (Garcia-Bustos et al. 2017).

## **2.3 Akční potenciál – vznik a šíření srdečním svalem**

Schopnost nezávisle tvořit vzruch, která je umožněna souhrou iontových kanálů na membráně buněk, je dána vlastností buněk hlavně v sinoatriálním uzlu. Těmito specifickými kanály jsou kalciový kanál CASQ2 a RYR2, ale také sodíkový kanál SCN5A (Park and Fishman 2011). Otevřením sodíkových kanálů dochází k pomalé depolarizaci membrány a v podstatě téměř okamžité repolarizaci, což ovšem platí pouze pro sinoatriální a atrioventrikulární uzel. Pro ostatní části převodního systému a pracovní myokard je typická fáze plató, kterou udržují vápníkové kanály s pomocí sodíkových kanálů. Depolarizace membrány je však mnohem rychlejší a práh je větší. Za pravidelné opakování rytmu neboli automacii, je zodpovědný specifický kanál HCN4 (Accili et al. 2002, DiFrancesco 2010), což je výměník  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Otevírá se neobvykle již během hyperpolarizace a tím dokáže opětovně vyvolat depolarizaci membrány.



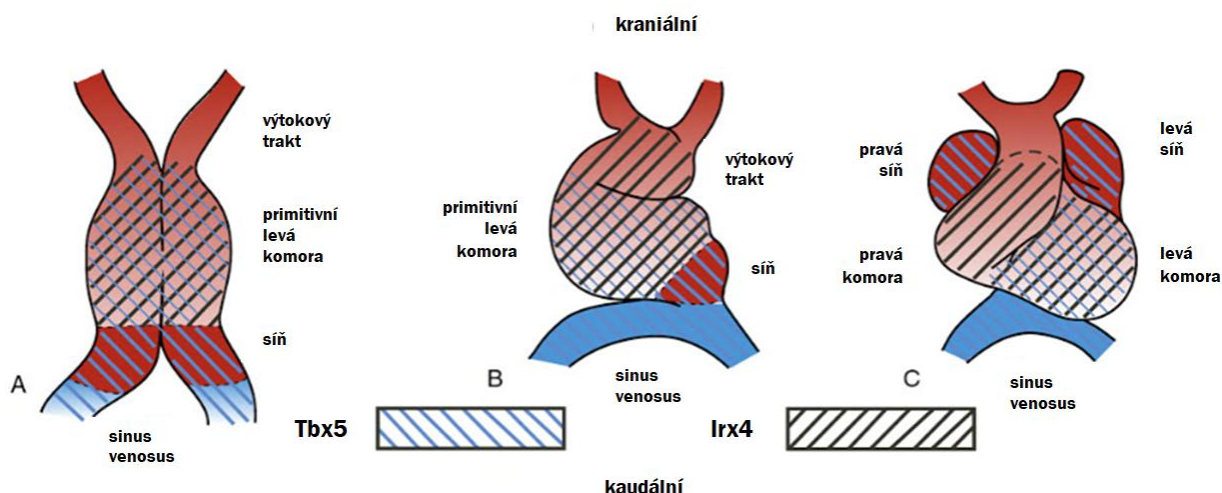
## 2.4 Vývoj převodního systému

### 2.4.1 Kardiogeneze

Srdce je unikátní orgán s neuvěřitelnou rychlostí vývoje, kdy je již záhy po svém vzniku schopno vykonávat svou funkci. Již kolem dvaadvacátého embryonálního dne u lidského zárodku je srdce schopno se rytmicky stahovat a během dalších dnů již pumpuje krev. U myši k tomu dochází ještě mnohem dříve a to kolem osmého dne embryogeneze - srdce je totiž prvním funkčním orgánem v zárodku (Mikawa 1999, Larsen et al. 2009). Srdeční progenitorové buňky jsou dopraveny z intraembryonálního mesodermu z kraniální části primitivního proužku během gastrulace a vytvářejí srdeční srpek (Larsen et al. 2009, Challice and Viragh 1973). Postupným ohýbáním a splýváním se vytváří endokardiální trubice (Savolainen et al. 2009). Primitivní trubice se skládá z vnitřního endokardu a silnější vrstvy myokardu (Manasek 1968), má tvar obráceného písmene ypsilon umístěného ve středu embrya (Moorman et al. 2003).

Síňový myozinový těžký řetězec - *Mhc1a* je selektivně exprimován buňkami síně u kuřecího embrya. Exprese *Mhc1a* je omezená pouze na oblast primitivní síně. Oproti tomu *Mhc1v*, komorový myozinový těžký řetězec 1, je exprimován všemi buňkami srdečního mesodermu. Ale tato exprese se objevuje jen v budoucích komorách. Regionalizace je u srdce pravděpodobně výsledkem dvou oddělených oblastí srdce v rámci primárního srdečního pole. *Irx4*, *Iroquois* homoprotein, je exprimován výhradně v kraniální části srpku, později se objevuje jen v komorových buňkách. Tento homoprotein je stimulován expresí *Mhc1v* a je potlačován expresí *Mhc1a*. *Irx4* je zodpovědný za kranio-kaudální určení srdce. Ztráta *Irx4* u myši má za následek ektopickou expresi síňových markerů v komoře. Transkripční faktor *Tbx5* je naopak spojován s determinací síňové linie a současně potlačuje vznik komorových buněk v síni. Na počátku je exprimován u vstupu srdečního srpku, ale je omezen na sinus venosus, síně a některé oblasti komory (Obr. 2). Absence *Tbx5* u myši se projevuje těžkou hypoplazií dutin. Oproti tomu nucená exprese tohoto transkripčního faktoru má za následek ztrátu komorově specifických genů. Mutace v *Tbx5* u lidí je podkladem Holt-Oramova syndromu, jehož projevem je malformace srdečních dutin (Larsen et al. 2009).

Při rozšiřování srdeční stěny myokardu vznikají první kontrakce (Mikawa 1999). Po prvotní kontrakci většina buněk v srdci ještě není příliš diferenciována a vnitřní struktury jsou málo rozlišené (Challice and Viragh 1973). Poté se srdeční trubice postupně prodlužuje a začíná se stáčet (DeHaan 1965), způsob stáčení srdeční trubice je u všech savců stejný (Yost 1995). Svým stáčením vytváří strukturu, která připomíná tvar písmene C. Vnější zakřivení vytváří pravou stranu a vnitřní je tvořena levou stranou tohoto písmene. Postupným kroucením a stáčením se objevuje srdeční klička. V této struktuře se budoucí komora sune doleva, primitivní síně jdou více kranálně a dorsálně. Po tomto prodloužení srdce dochází k úpravám a změnám, které vedou k tvorbě



**Obrázek 2: Schematický popis exprese transkripčních faktorů Irx4 a Tbx5 během počáteční srdeční specifikace dutin.**

*Irx4 je transkripční faktor řídící *Mhc1v* a tlumí *Mhc1a* expresi. Objevuje se výhradně v oblasti, kde se vyskytují komorové buňky. Zatímco *Tbx5* je spojován spíše s fenotypem síní, později je výhradně v síních a sinus venosus (upraveno dle Larsen et al. 2009).*

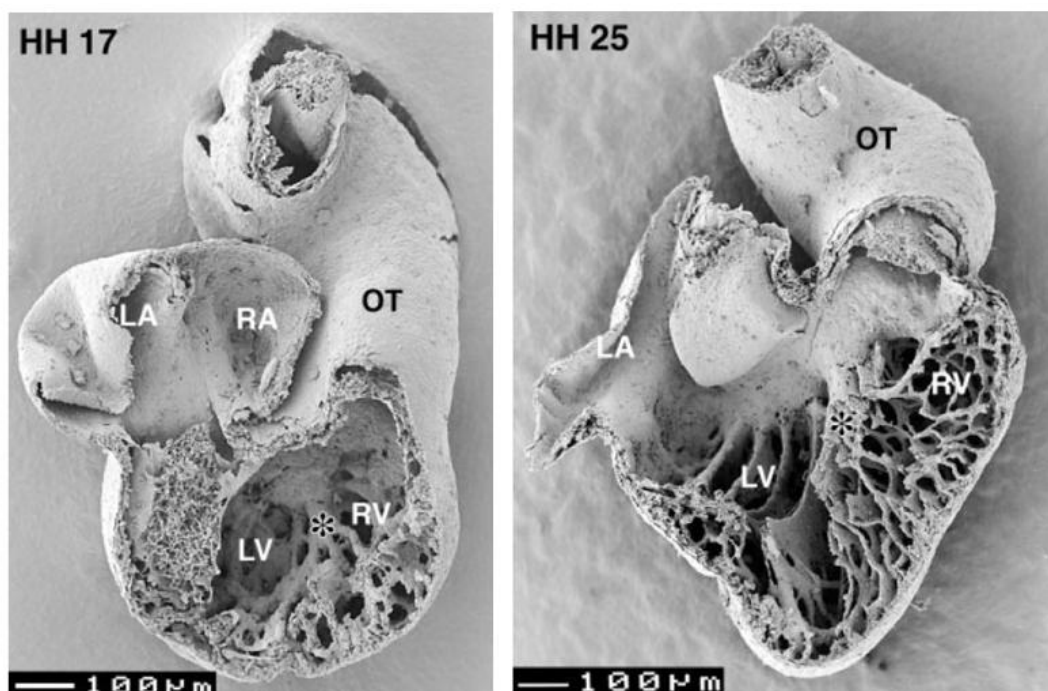
budoucích dutin (Larsen et al. 2009). Později začíná proces rozdělení síní a komor (Moorman et al. 2003). Brzy na to navazuje i pozvolný vývoj koronárního cévního zásobení srdce. Současně se začínají tvořit trabekuly v komorách, svou strukturou připomínají hustou houbovitou síť (Savolainen et al. 2009). Komorové trabekuly mají na starost cévní zásobení myokardu v době, kdy koronární cévy nejsou ještě plně vyvinuté (Mjaatvedt et al. 1999). Trabekuly jsou dále klíčové pro vývoj převodního systému (De Jong et al. 1992). Plán vývoje plnohodnotného srdce z prosté trubice se shoduje u většiny obratlovců (Savolainen et al. 2009, Sedmera 2011). Po dotvoření mezikomorového septa už nedochází k výrazným změnám ve funkci, struktuře či lokalizaci převodního systému (Reckova et al. 2003).

Struktura myokardu se během embryogeneze mění a zároveň dochází ke zpevnění bazálního podkladu trabekul (Sedmera 2011, Sedmera et al. 2000). Ve struktuře trabekul se začínají objevovat rozdíly stran, u myši tento rozdíl není nijak výrazný, u ptáků je mnohem výraznější (Sedmera et al. 2000). Po vzniku trabekul dochází k urychlení vedení a je to důležitý základ pro His – Purkyňův systém (Reckova et al. 2003, Sedmera et al. 1998). Vnitřní trabekulace roste pomaleji než okolní vnější kompaktní myokard a u kuřat začíná výrazně narůstat až v druhé polovině inkubace. Vývoj trabekul u kuřat prochází třemi stádii, která jsou podobná i u myši a lidí (Vuillemin and Pexieder 1989).

## 2.4.2 Počáteční vývoj kuřecího srdce

Srdce kuřecích embryí vzniká v mnoha krocích velmi podobně jako srdce savců či jiných obratlovců. Je zde ale několik časových odlišností, například srdce kuřat je už do 36 hodin po oplození schopno začít plnit svou funkci (Kirby 2007). Nejprve se vytvoří jednoduchá srdeční

trubice, která se u kuřecích embryí objeví ve stádiu 8 dle Hamburgera a Hamiltona (stádium HH8), což odpovídá 26-29 hodinám vývoje. Hamburgerovo a Hamiltonovo rozdělení vývoje kuřecího embrya je na 46 stadií (Hamburger and Hamilton 1951). Náznak budoucích komor se začíná objevovat ještě před prvními srdečními stahy. Vznik srdeční kličky a stočení srdeční trubice doprava se objevuje ve stádiu HH11 (40-45 hodin). Postupně se mění rychlost vedení akčního potenciálu k vyšším hodnotám ve stádiu HH15 (50-55 hodin) (De Jong et al. 1992, Wittig and Münsterberg 2016). Ve stádiu HH16 (51-56 hodin) se mezi síněmi a komorou vytváří atrioventrikulární kanál, který má důležitou úlohu v embryonálním srdci (Patten et al. 1948). Od tohoto období se také vytváří trabekuly. Později se formuje mezikomorové septum a je jasné rozdělení mezi komorami (Sedmera et al. 2004) (Obr. 3). Následně se vytváří endokardiální polštářky, které se později podílejí na vzniku chlopní (Oosthoek et al. 1998). Ve stádiu HH23 (ED4) má srdce již jasně definované srdeční segmenty, srdeční stěna má tři vrstvy. Od dalšího stádia HH24 funguje víceméně plnohodnotně, i když není ještě plně septováno (Kirby 2007, Wittig and Münsterberg 2016).



**Obrázek 3: Morfologie komor v obraze rastrovacího elektronového mikroskopu.**

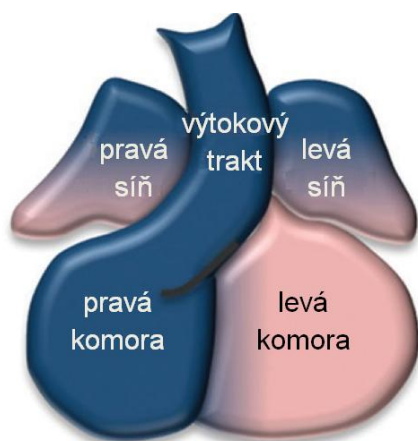
*Pohled ze zadní části srdce kuřecích embryí ve stádiu HH17 a HH25. LA = levé síň, RA = pravá síň, OT = výtokový trakt, LV = levá komora, RV = pravá komora a \* je naznačeno vznikající interventrikulární septum. (Sedmera et al. 2004)*

### 2.4.3 Role srdečních polí v srdci

Dřívější klasický pohled na kardiogenezi byl před více jak deseti lety pozměněn. Původně se předpokládalo, že myokard vychází jen z jednoho zdroje prekursorů. Bylo zjištěno, že označené

buňky v srdeční trubici kuřete neměly společného předka (Garcia-Martinez and Schoenwolf 1993). Srdce tedy vzniká ze dvou odlišných prekursorů, což s sebou přináší koncept srdečních polí (Buckingham et al. 2005) neboli myokardiální linii (Meilhac et al. 2004a). V jiné studii Brande a kol. zjistili, že u obojživelníků existuje pouze jedna srdeční prekursorová linie. Tato linie je však heterogenní a obsahuje překrývající se populaci *Isl 1* a *Nkx 2.5* prekursorů (Brade et al. 2007).

Buňky primárního a sekundárního pole jsou odděleny ze společného základu ještě před vznikem srdečního srpku během časně gastrulace. Studie sledující osudy těchto linií využila retrospektivní klonální analýzu se značením  $\beta$  – galaktosidázy v linii myši (Buckingham et al. 2005). Ve stádiu srdečního srpku buňky exprimují *Fgf10* a *Isl1*, což jsou indikátory sekundárního



**Obrázek 4: Rozdělení dvou základních srdečních polí.**

*Do primárního srdečního pole (růžově) patří pravá a levá síň, levá komora. Druhé srdeční pole (modře) zahrnuje pravou komoru a výtokový trakt. Nejsou přesně definované hranice mezi dutinou či segmentem (upraveno dle Kelly et al. 2014).*

srdečního pole. Sekundární srdeční pole leží mediálně k srdečnímu srpku. Je ovlivněno expresí proteinů rodin *Bmp* a *Fgf* z faryngeálního endodermu a aktivuje srdeční transkripční faktory. Nicméně srdeční srpek pochází z primárního srdečního pole (Larsen et al. 2009, Meilhac et al. 2004b). Specializace linie sekundárního pole je u buněk opožděna díky faktorům *Wnt* a *Chordin*. Sekundární pole má vliv na buňky až ve stádiu počáteční primitivní srdeční trubice (Larsen et al. 2009). Do druhého srdečního pole patří pravá komora a výtokový trakt. Primární srdeční pole zahrnuje pravou a levou síň, levou komoru (viz. Obr. 4). Linie rozdělující srdeční pole není přesně dána hranicí dutin či srdečních segmentů (Kelly et al. 2014, Meilhac et al. 2004b). V další studii se spekuluje o třetím srdečním poli, které zajišťuje formaci sinoatriálního uzlu (Bressan et al. 2013).

#### 2.4.4 Vývoj převodního systému - srovnání kuřecího a myšího modelu

Převodní systém se u obou druhů plně vyvíjí po formaci jednotlivých srdečních dutin. Jde o období nejvyšší buněčné proliferace, která poté zase zvolna klesá (van den Berg et al. 2009). Prvotní pacemaker se však vytváří už v trubicovém srdci, kde se nachází ve vtokové oblasti. Vedení vzruchu je ještě velmi pomalé (Mikawa and Hurtado 2007). Brzy poté se při převodu ze síní do komor objevuje typické zpoždění, což je způsobené právě pomalým vedením přes atrioventrikulární kanál (Sedmera et al. 2000, Sedmera 2011, Paff et al. 1964). Přesun hlavního

pacemakeru do sinoatriálního uzlu úzce souvisí s dozráním tohoto uzlu (Viragh and Challice 1983). U myši nastává již 11. embryonální den (Benes et al. 2014, Sankova et al. 2012). U kuřat je to podobné, jen zahájení impulsu se objevuje už na 29-31 stádiu HH (6. -7. embryonální den) (Reckova et al. 2003). Není mnoho studií zaměřených na mechanismus diferenciacce a vzniku sinoatriálního uzlu a na to, jak dochází k převzetí jeho hlavní funkce - pacemakeru (Mikawa and Hurtado 2007). Buňky převodního systému jsou však poměrně jasně morfologicky rozeznatelné od běžných myocytů. Dokonce jsou ještě navíc obalené speciálními buňkami, které je izolují od myokardu (Verheijck et al. 2001, Christoffels et al. 2010). Podobně jsou na tom kuřata i myši s počátkem funkce levého raménka, u myši nastává 12. embryonální den a u kuřat v 35 stádiu HH (8. – 9. embryonální den). Doba inkubace nebo březosti u obou druhů je 20-21 dnů (Reckova et al. 2003), nicméně je velký rozdíl ve stupni rozvoje mezi druhy. Jsou dvě hypotézy vzniku buněčné heterogenity tohoto uzlu, není ovšem ještě stále jasné, která je ta pravá. Gradientní model vychází z předpokladu, že dochází k postupné přeměně od periferie k okraji. Mozaikový model navrhuje, že se buňky uspořádají od okraje ke středu (Mikawa and Hurtado 2007).

Obdobně jako sinoatriální uzel i atrioventrikulární uzel se skládá z heterogenní tkáně. Funkčně jsou však podobné jako ostatní části převodního systému, také u nich zůstává jistá podobnost primitivních myocytů (Mikawa and Hurtado 2007). Původ atrioventrikulárního uzlu je díky společným prekurzorům přisuzován atrioventrikulárnímu kanálu. Mají stejnou funkci i projev a lokalizace je také obdobná (Eichna and Dehaan 1961). V podstatě celá primitivní srdeční trubice se skládá jen z prekurzorů atrioventrikulárního kanálu a levé komory (Buckingham et al. 2005). Vznik definitivního atrioventrikulárního uzlu bude asi mnohem složitější, než je zatím představováno. Předpokládá se, že zde bude docházet k víceúrovňovému mechanismu vývoje (Mikawa and Hurtado 2007).

Ve vrcholové části komorového septa se vyvíjí Hisův svazek (Viragh and Challice 1983). Hisův svazek a síť vláken má jiný původ než atrioventrikulární kanál, odštěpuje se brzy na začátku vývoje (Christoffels et al. 2010). Pravé a levé Tawarovo raménko vzniká ze subendokardiálních myocytů podél komorového septa (Viragh and Challice 1983). Přeměnou jednotlivých klonů myocytů vznikají subendokardiální Purkyňova vlákna (Gourdie et al. 1995). Nárůst komorového tlaku vede k rychlejší maturaci převodního systému (Reckova et al. 2003). Oproti tomu snížení mechanické zátěže způsobuje hypoplazii levé komory, dozrání převodního systému je v levé komoře pomalejší. Tyto změny jsou doprovázeny regulací diferenciačního markeru převodního systému Cx40 (Hall et al. 2004).

O původu převodního systému se vedlo mnoho spekulací. Dlouho se rozhodovalo, zda je převodní systém spíše myogenního či neurogenního původu. Zásadní indicií pro neurogenní původ byla podobnost proteinů převodního systému a neurofilament (Gorza et al. 1988, Vitadello et al.

1998). Bylo však prokázáno, že převodní systém vzniká pouze z kardiomyocytů a jiný zdroj nemůže vést ke vzniku těchto speciálních buněk (Cheng et al. 1999, Gourdie et al. 1995). Jde o poměrně speciální schopnost se diferencovat z kontraktálních buněk (Gourdie et al. 1995). Tato diferenciace z myocytů se odehrává výhradně podél endokardu a podél větvení vyvíjejících koronárních arterií (Cheng et al. 1999, Gourdie et al. 1995). Tato hemodynamická aktivace je u ptáků iniciována signální molekulou endotelin. Ten dokáže u kuřat indukovat diferenciaci Purkyňových vláken z běžných myocytů (Gourdie et al. 1998). U nich je totiž perivaskulární síť vytvořena velmi hluboko až do tloušťky svaloviny komor, zatímco u lidí a myší se Purkyňova vlákna vyskytují pouze v subendokardiální vrstvě (Gourdie et al. 1995, Miquerol et al. 2003).

Není však jisté, jestli tento model vývoje je použitelný i pro savce (Miquerol et al. 2010). U savců je vývoj převodního systému méně závislý na myokardu (Gourdie et al. 1995, Gourdie et al. 1998, Moorman et al. 2003). U myší má signalizační funkci obdobnou endotelinu ve formování převodního systému neuregulin (Rentschler et al. 2002). Tyto dvě signální molekuly jsou nepostradatelné v počáteční kardiogenezi a regulují mnoho dalších faktorů. Jedním z regulátorů genového programu diferenciace převodního systému u savců je transkripční faktor *Nkx 2.5* (Komuro and Izumo 1993, Patel and Kos 2005). Stále není jisté, zda tyto geny jsou jedinými, které odpovídají za diferenciaci převodního systému, či zda vznik převodního systému není zajištěn interakcemi mezi těmito a dalšími faktory (Patel and Kos 2005).

*Nkx2.5* je gen klíčový pro kardiogenezi. Je nezbytný pro formování, diferenciaci a udržování převodního systému v srdci (Jay et al. 2004). Jde o jeden z prvních detekovatelných genů v srdci a může mít na svědomí aktivaci srdečních progenitorů (Searcy et al. 1998). Určuje specifikaci buněk do jednotlivých tkání, je zapojen do vyžrávání buněk či tkání srdce (Genis et al. 2008) a je nutný pro expresi Cx 40 (Komuro and Izumo 1993). U lidí se nachází na pátém chromozomu se dvěma exony (Shiojima et al. 1999) a u myší se vyskytuje na sedmnáctém chromozomu (Lyons et al. 1995). Během života je tento gen klíčový v ochraně před cytotoxickými látkami v dospělém srdci (Akazawa and Komuro 2003). Podobný *Nkx2.5* je homeotický gen, neboli *Hox* gen. Má klíčovou roli během embryonálního vývoje mnohobuněčných živočichů. Jeho funkcí je kontrolovat celkový vývoj embrya. A ovlivňuje, co se v jaké části těla bude vyvíjet (Pearson et al. 2005).

#### **2.4.4.1 Postnatální vývoj převodního systému**

Většina prenatálního růstu srdce je založená na hyperplazii, tedy zajištěná buněčnou proliferací buněk (Clark and Hu 1982, Sedmera and Thompson 2011, Vostarek et al. 2014). Růst a pokračování vývoje nekončí s narozením či vylihnutím, často přetrvá ještě do počátečního postnatálního období. Obvykle záhy dochází k přepnutí z hyperplazie na hypertrofii - růst zajištěný zvětšováním buněčného objemu, ale nemusí tomu tak být u všech druhů. Tento přechod často

nastává v prvních dnech po vylíhnutí či narození (Li et al. 1996). U myší trvá hyperplastický růst buněk až do čtvrtého dne po narození, zatímco objem buněk zůstává téměř konstantní. Poté nastává zlom a dochází k prudkému nárůstu buněčného objemu (Leu et al. 2001). Způsob růstu se velmi podobá růstu buněk u potkanů (Li et al. 1996).

U kuřat je postnatální růst zajištěn kombinací hyperplazie a hypertrofie (Gerdes et al. 1983). Kuřecí kardiomyocyty mají schopnost buněčné proliferace postnatálně velmi dlouho, dle výše zmíněné studie až 6 týdnů, déle však sledování nebylo provedeno. Mění to představu o možném ukončení proliferace s narozením či vylíhnutím a velmi je odchyľuje od podobnosti růstu u savců (Li et al. 1996). U novorozených selat je růst zajištěn hlavně hypertrofií a to až do čtrnáctého postnatálního dne (Beinlich et al. 1995). Současně s tímto bývá často sledována jadernost buněk, pro hlodavce je obvyklá dvoujadernost v dospělých srdcích (Li et al. 1996). U potkanů bylo zjištěno, že do čtvrtého postnatálního dne byla většina buněk jednojaderná. Poté, co skončí období kombinace hypertrofie a hyperplazie, má většina buněk dvě jádra, obdobně jako je tomu u dospělých. V období hypertrofie je množství dvoujaderných buněk shodné s předchozí fází (Clubb and Bishop 1984). Žádná studie nebyla však zaměřena na rozdíly v jadernosti nebo styl růstu mezi kardiomyocyty a Purkyňovými vlákny.

Prenatální vývoj srdečních buněk u lidí je v rozmezí 14. až 25. týdne charakterizován velmi hojnou proliferací. Posledních deset týdnů se buňky stále dělí, ale mnohem pomaleji. Zároveň se objevuje rapidní růst velikosti buněk. Při narození mají kardiomyocyty poloviční velikost dospělých srdečních buněk. Počet srdečních buněk při narození odpovídá pouze 20% množství kardiomyocytů u dospělých jedinců (Widdowson et al. 1972). Jiné studie ukazují, že přibližně 25% kardiomyocytů je dvoujaderných při narození a tento počet zůstává i během života (Olivetti et al. 1996). Dále bylo navrženo, že obměna kardiomyocytů je možná do věku pěti let (Beltrami et al. 2001). Tento předpoklad byl zavržen, ukončení proliferace v postnatálním období je variabilní mezi jednotlivci a klesá během života. Pokles za jeden rok života se odhaduje na 0,5%. Není už jasné, zda tento klesající trend je zde již od narození nebo nastane během dětství (Bergmann et al. 2009).

## **2.5 Propojení srdečních buněk**

Buněčná spojení zajišťují komunikaci mezi buňkami. Purkyňova vlákna a komorové myocyty bývají propojeny přímo nebo přes přechodné buňky. Mezi buněčné spoje patří např.: zonula occludens, zonula adherens, macula adherens. Nejvíce dominuje macula adherens, projevuje se jako bodové splynutí membrán, zejména u koz a ovcí. Spojení typu zonula occludens je méně časté a je o něco kratší než v jiných buňkách. Interkalární disky mívají konstantní tloušťku 20-30  $\mu\text{m}$ , někdy i silnější (Sommer and Johnson 1968). Dále mohou být Purkyňova vlákna a pracovní myocyty propojeny přechodnými či kontaktními buňkami (Tranum-Jensen et al. 1991). Studie propojení

pracovních myocytů a Purkyňových vláken odhalila silný úbytkový trend směrem k bázi. To vysvětluje brzkou apikální aktivaci. Přímé propojení mezi Purkyňovými vlákny a kardiomyocyty je zde signifikantně rostoucí od báze směrem k apexu, kde je dokonce přes 70% spojení (Garcia-Bustos et al. 2017).

Mezi jednotlivými druhy se vyskytují výrazné rozdíly, některé druhy jako například myši mají téměř všechna Purkyňova vlákna a pracovní myocyty propojené na povrchu, ale potkani mají i intramurální Purkyňova vlákna. U ptáků a u některých kopytníků existují Purkyňova vlákna, která zasahují do myokardu. Pracovní myocyty jsou s Purkyňovými vlákny propojeny podélně (Vigmond and Stuyvers 2016). Naproti tomu u prasat se propojení objevuje na distálním konci Purkyňových vláken, což zajišťuje okamžitou aktivaci (Meijborg et al. 2014).

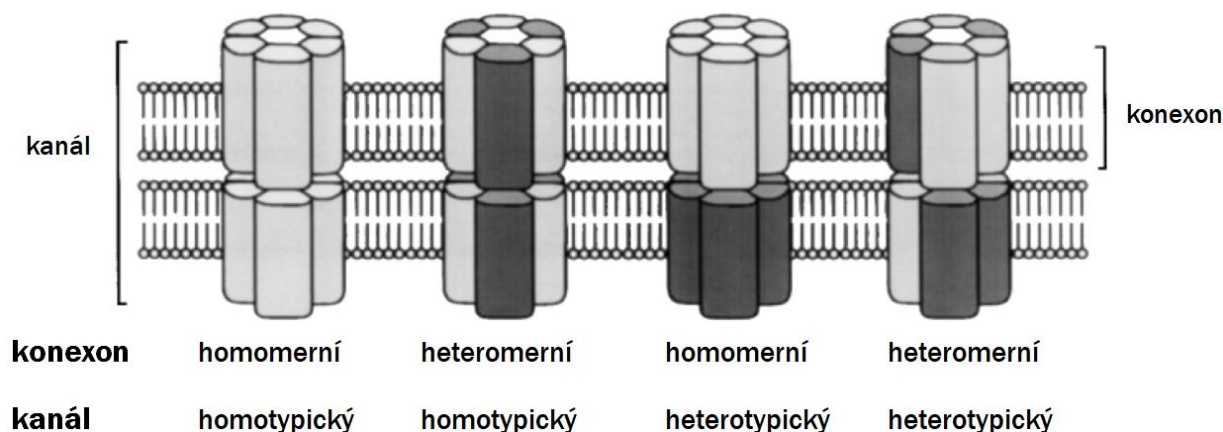
### 2.5.1 Gap junction

Dalším typem buněčného propojení je propojení typu gap junction tvořené konexiny. Někdy může být nazýván i nexus, mezerový spoj nebo komunikační spoj. V tomto spoji jsou cytosoly dvou sousedních buněk propojené metabolicky a elektricky pomocí pórů v membráně. Díky nim je možný plynulý přestup iontů, druhých posílů, malých metabolitů a dalších molekul (do velikosti 1 kDa) mezi buňkami. Je pro ně typické, že mají nízkou specifitu, ale zato jimi prochází velká škála molekul (Sáez et al. 2003). Vyskytují se ve všech tkáních až na diferenciované kosterní svaly, červené krvinky a dospělé spermatické buňky (Nielsen et al. 2012).

Základem těchto kanálů jsou konexiny, transmembránové proteiny. Jsou tvořeny čtyřmi transmembránovými  $\alpha$ -šroubovicemi, dvěma extracelulárními kličkami, jednou intracelulární kličkou a dvěma konci (Jalife et al. 1999). Jednotlivé druhy konexinů se rozlišují podle délky C-konce (Unger et al. 1999). C - konec a N – konec mají vždy intracelulárně. Obsahují cytoplazmatický ocásek, který může zabránit průchodu dalších molekul skrz kanál. Na tento ocásek je možné navěsit aequorin nebo green fluorescent protein (GFP) a využít pro značení fluorescenční mikroskopie. Tyto molekuly později ovlivní rychlost uzavírání kanálu (Bukauskas et al. 2001).

Konexiny se vždy skládají do hexamerů a tím vytváří polokanál – konexon. Gap junction může být homomerický, ve kterém jsou všechny konexinové proteiny identické, nebo heteromerický, kde se vyskytují dva a více typů konexinů. Dále je možno rozdělit na homotypický kanál, kdy jsou obě části v každé buňce shodné či heterotypický, pokud se polokanály liší (Kanno and Saffitz 2001) (viz obrázek 5). Tyto možné variace nabízejí obrovskou diverzitu ve složení a funkci





**Obrázek 5: Způsoby propojení konexonů s možností variabilních konexinů.**

(upraveno dle Kanno and Saffitz 2001).

kanálu (Nielsen et al. 2012). Bylo objeveno 21 konexinových genů v lidském genomu a 20 genů v myším genomu (Söhl and Willecke 2004), což přináší velké množství kombinací, avšak ne všechny konexiny jsou společně kompatibilní (Nielsen et al. 2012). Typy konexinových proteinů rozhodují o tom, které látky budou procházet kanálem (Goldberg et al. 1999). Následkem toho jsou specifické rozdíly ve vlastnostech konexinů. Složení a množství gap junction bude rozdílné dle typu buňky (Nielsen et al. 2012).

Po propojení konexonů vzniká kanál mezi dvěma buňkami s průměrem 1,5 - 2 nm (10 – 15 anstrémů). Buňky jsou od sebe vzdálené 2 – 4 nm. Samotný vznik kanálu z monomerů konexinu je poměrně složitý proces (Musil and Goodenough 1991, Musil and Goodenough 1993). Transkripce je řízena transkripčními faktory konexinových genů. Následně jsou kotranslačně vloženy do endoplazmatického retikula. V endoplazmatickém retikulu dochází k maturaci a správnému sbalení konexinů, poté pokračují do Golgiho aparátu. Odtud je již oligomerizovaný konexon (polokanál) dopraven na plazmatickou membránu za spolupráce s cytoskeletem (Nielsen et al. 2012). Na membráně dochází k propojení s polokanálem protilehlé buňky. Kromě přímé regulace transkripčními faktory může být jejich vznik ovlivněn i epigenetickou regulací (acetylace histonu, metylace DNA či mikro RNA) nebo dalšími faktory (fosforylací, pH nebo napětím) (Nielsen et al. 2012, Sáez et al. 2003).

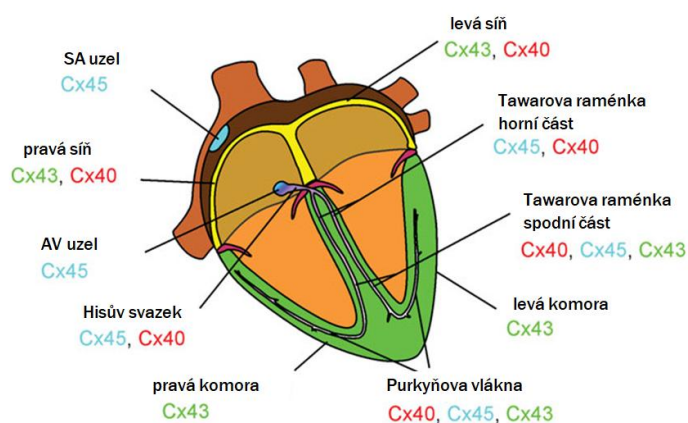
Propustnost kanálů je ovlivněna možností se otevírat a zavírat. Mají vlastní vrátka a některé se zavírají rychle, jiné kanály naopak pomalu. Aktivita kanálů je regulována změnou v napětí, koncentrací vápníku, pH, fosforylací a proteinovou interakcí. Změna napětí může být v rozdílu mezi spoji, tedy mezi-spojové napětí. Dalším typem je transmembránové napětí, které vzniká podél póru v membráně mimo buňku. Tento typ se objevuje u inextrinů, což je analog konexinů u hmyzu (Bukauskas and Verselis 2004). Většina konexinů požaduje napětí ke svému zavření, některé to

mají zase přesně naopak. Zavření změnou chemického složení je většinou způsobené koncentrací vápníku nebo pH, ale může být také způsobené exogenní chemikálií či farmakologickým činidlem. Nastavená hodnota pH je velmi variabilní pro každý konexin. Prudký nárůst koncentrace vápníku vede k rozpojení dvou polokanálů od sebe ve většině tkání. Je to považováno za ochranný mechanismus před poškozením od sousední umírající buňky či způsobenou jinou patologií (Nielsen et al. 2012).

### 2.5.1.1 Srdeční gap junctions

V kardiomyocytech jsou exprimovány převážně tyto konexiny Cx40, Cx43 a Cx45 (Severs et al. 2004). Jejich funkce je zde klíčová pro přenos elektrického proudu mezi buňkami myokardu. Rychlost převodu signálu závisí na množství spojů gap junction, dále je důležitý typ a velikost buňky či rozložení těchto spojů. Buňky jsou pomocí gap junction propojené hlavně v oblasti zvané interkalární disk na konci myocyty u většiny zkoumaných zvířat (Ono et al. 2009, Severs 1990), ale například u potkanů převládá boční propojení mezi myocyty v subendokardu (Ono et al. 2009).

Jednotlivé typy gap junctions se v srdci liší v lokalizaci. Cx43 se vyskytuje hlavně v pracovních myocytech komor (Severs et al. 2004), zato síňové myocyty exprimují kombinaci Cx40, Cx43 a Cx45 (Nielsen et al. 2012, Davis et al. 1995). V převodním systému se vyskytuje převážně Cx40, který se vyznačuje velkou vodivostí, ale v menším počtu se objevuje i Cx43 (Severs et al. 2004). Cx43 je klíčový během vývoje srdce (Nielsen et al. 2012) (Obr. 6). Dle studií u myši je dalším konexinem srdce Cx31.9 (myši Cx30.2), který má velmi malou rychlost vedení. Pravděpodobně hraje velmi důležitou roli v pomalé propagaci signálu skrz atrioventrikulární uzel,



**Obrázek 6:** Shrnutí typického rozložení konexinových kanálů v dospělém srdci savců.

(upraveno dle Severs et al. 2008).

u lidí to však nebylo potvrzeno (Kreuzberg et al. 2006). Cx40 je exprimován v brzkém embryonálním vývoji a jeho zmizení z komory nastane pár dnů poté (Delorme et al. 1997). Jeho exprese je řízena transkripčními faktory *Tbx5* (Bruneau et al. 2001) a *GATA4* (Linhares et al. 2004), útlum v komorách je pravděpodobně způsoben *HRT2*, který funguje jako represor jeho transkripčních faktorů (Koibuchi and Chin 2007).

Mezi základní srdeční konexiny u kuřat patří Cx42, Cx43 a Cx45. Expresce Cx42 a Cx43 se objevuje během celého vývoje srdce a i v dospělosti u kuřete (Beyer 1990). Tento fakt byl potvrzen

mnohem dříve, kde prezentovali přítomnost konexinové struktury ve všech stádiích vývoje (Manasek 1968). Cx42 se obvykle objevuje v komorové části srdce, která zahrnuje Hisův svazek, Tawarova raménka a Purkyňova vlákna. Tento konexin se však neobjevuje v pracovních myocytech či jiné části převodního systému (Gourdie et al. 1993a). Cx43 se naopak vyskytuje v celém kardiovaskulárním systému a hlavně v pracovních myocytech (Larson et al. 1990, Gourdie 1995). Zároveň oba dva byly nalezeny velmi hojně v hladkém svalstvu koronárních cév (Gourdie et al. 1993a). Přesné rozšíření jednotlivých typů konexinů u ptáků není známo. Celkově se ptačí konexiny mezi sebou velmi liší ve vodivosti a regulačních vlastnostech (Veenstra et al. 1992). Ptačí konexiny se úplně neshodují v složení aminokyselin se savčími gap junctions (Beyer et al. 1989). Psí Cx40 má 70 % shodu v aminokyselinovém složení s kuřecím Cx42. Cx45 u psů je shodný se svým ptačím homologem v 85 % (Beyer 1990). Psí Cx43 je téměř identický (97 %) s kuřecím Cx43 (Gourdie et al. 1993a).

Gap junctions jsou také spojovány se srdečními nemocemi, jejich porucha vede k srdečním arytmiím nebo náhlé srdeční smrti (Severs et al. 2008). Problém bývá ve snížení počtu nebo heterogenitě exprese konexinů, což vede ke zpomalení převodu a zesílení diskontinuity (Jansen et al. 2010). U lidí s ischemickou chorobou srdeční, selháním srdce či hypertrofickou kardiomyopatií byly nalezeny změny v distribuci a geometrii těchto kanálů. Proto se v minulých letech začaly zkoumat interakce konexinů s různými molekulami buňky (Giepmans 2004).

## 2.6 Hypotermie

Další kapitolou přehledu literatury bude hypotermie, protože změna teploty velmi ovlivňuje fyziologickou odpověď organismu. Savci a ptáci patří do skupiny homotermů, jejichž organismus je schopen udržovat konstantní teplotu a to i navzdory změně teplotních podmínek v okolí. Fyziologická odpověď na změnu teploty brání velké ztrátě tepla organismu či přehřátí organismu. Hypotermie je definována jako teplota nižší o dva stupně než je normální teplota jádra (Pozos and Wittmers 1983, Pozos and Danzl 2001, Segers et al. 1998). Opakem k hypotermii je hypertermie, která je určena navýšením teploty o několik stupňů. Normální teplota jádra pro dospělého člověka se pohybuje kolem 37°C pro mozek, srdce a ledviny. Počáteční hodnota hypotermie je od 35°C, ale za určitých podmínek je možné, že příznaky hypotermie budou vykazovány i při teplotě 36°C (Pozos and Danzl 2001).

Hypotermie může mít více příčin. Primární příčina hypotermie je dána neefektivní reakcí organismu na změnu prostředí. Sekundární je způsobená poškozenou termoregulací jako následek nemoci, únavy či zranění. Zde je tělu dovoleno tolerovat mnohem větší chlad než je normální, i když to ohrožuje integritu organismu. Posledním důvodem hypotermie je klinicky vyvolaná hypotermie (Pozos and Danzl 2001, Hildebrand et al. 2004, Segers et al. 1998). Nástup hypotermie

a její případné zhoršení velmi závisí na několika faktorech, jako například na velikosti těla, stupni metabolismu, množství tuku, výživě, hydrataci nebo u lidí množství a kvalitě oblečení (Pozos and Danzl 2001, Hervey 1973). Hypotermie může být rozdělena na tři fáze: mírná, střední a silná (Pozos and Danzl 2001, Hildebrand et al. 2004). Nejnižší teplota zchlazení lidského organismu a jeho opětovné ohřátí byla 15°C (DaVee and Reineberg 1980). Hodnoty nejnižších teplot jsou velmi odlišné u jednotlivých druhů, u psa to je teplota v rozmezí 18-20°C a u potkana 13-15°C (Hervey 1973).

Hypotermie může mít i přínosný efekt. Příkladem je prodloužení životnosti orgánu a prevence před hypoxií orgánu nebo začátku zánětlivé odpovědi. V dnešní době je možné využití indukované hypotermie hlavně při operativních zákrocích, kterými jsou např. transplantace: kardiochirurgie nebo neurochirurgie. Při nižší teplotě těla jsou i nižší požadavky tkání na kyslík. To dovoluje vyloučení orgánu z cirkulace při operacích na mnohem delší dobu (Bigelow et al. 1950). Dokonce již 3500 př. n. l., v nejstarším textu Edwin Smith Papyrus, je hypotermní efekt používán terapeuticky. Používaly se lokální studené aplikace na rány hlavy a na infikovaná nebo vředovitá prsa (Breasted 1930). Později příznivého efektu hypotermie používali i v Hippokratově škole při podvrtnutí, otoku, zlomenině nebo i při křečových stavech (Adams 1849). Později bylo zchlazení organismu využito jako způsob anestezie, chladová narkóza se objevuje při teplotě 28°C (Bigelow et al. 1950).

Nejlepší by bylo měřit rovnou teplotu jádra, ale zařízení pro měření teploty jádra nejsou snadno dostupná. Proto se teplota jádra určuje měřením v ústech, rektálně, v podpaží, tympanicky a v jícnu (zde je teplota běžně o 1°C nižší než teplota jádra). Teplotu periferie není možné využít k určení teploty jádra. Obvykle je teplota jádra porovnávána vzhledem ke změnám v periferii. Toto srovnání periferní a teploty jádra probíhá v hypotalamu. Udržení a kontrola teploty jádra závisí na teplotní citlivosti periferního systému (Pozos and Danzl 2001).

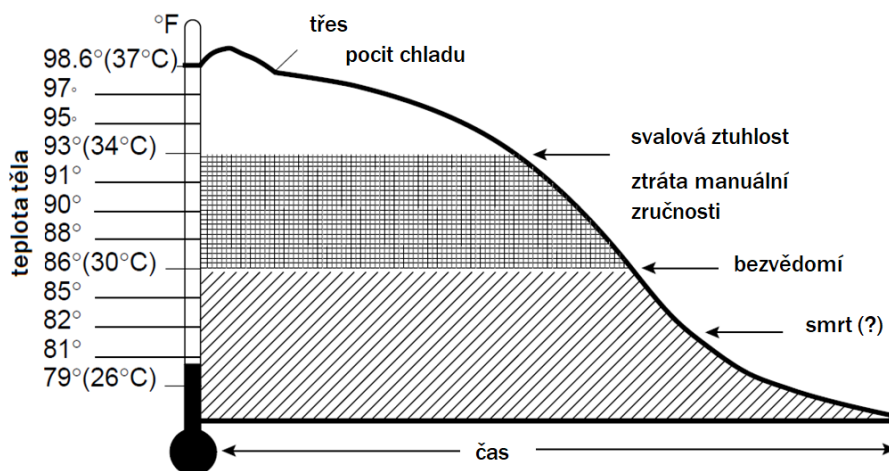
Informaci o změně teploty v okolí organismu zjišťují teplové a chladové receptory v periferii. Závisí na rozdílech mezi jádrem a periferií, podle toho přenáší zprávu o teplotě do centrální nervové soustavy. Teplové i chladové receptory mají po aktivaci tonické vzplanutí. Chladové budou reagovat na chladový stimul s dočasnou excitací, poté zůstanou jejich frekvence signálů konstantní, zato budou inhibovány vysokou teplotou. Existují dva typy chladových receptorů, jsou uloženy hluboko v kůži nebo povrchově, většina se však vyskytuje v periferii. Přenos informace z chladových receptorů zajišťují málo myelizovaná vlákna nebo C vlákna. Vypálí při teplotě 25 – 33°C a rychle se adaptují do nového statického rozpoložení (Trojan 2003, Silbernagl and Despopoulos 2004, Ganong 2005).

Signály z odlišných aferentních vláken vstupují do míchy ve dvou stupních. První je trigeminální, tedy vycházející z obličeje, a druhý ze zbytku těla (Dawson et al. 1981). Pokračují

spinotalamickou dráhou a jsou promítnuty přímo v thalamu, dále se dostávají do hypotalamických jader, kde je informace zpracována. Dle potřeby dojde k aktivaci centrálního a autonomního nervového systému, které dále mobilizují ostatní systémy: dýchací, vylučovací, kardiovaskulární, endokrinologický, svaly a také chování. První a hlavní fyziologickou odpovědí na chlad je periferní vazokonstrikce cév, která brání dalším ztrátám tepla. Je řízena autonomním nervovým systémem a má za úkol vyvolat pocit chladu (Trojan 2003, Silbernagl and Despopoulos 2004, Ganong 2005).

### 2.6.1 Vliv hypotermie na organismus

Každý fyziologický systém má vlastní odpověď na pokles teploty jádra, která dohromady dává příznaky hypotermie (Obr. 7). Porozumění každému systému je nezbytné, neboť každý systém komunikuje s ostatními. Jak již bylo zmíněno výše, první reakcí na chlad je periferní vazokonstrikce, obvykle se týkající prstů rukou či nohou, nebo dalších periferních částí těla (uši, nos, brada) (Hervey 1973, Pozos and Danzl 2001). Tato vazokonstrikce může být následována vazodilatací, která brání poškození tkáně před ischemií (Hervey 1973). Keatinge ukázal, že vazodilatace je způsobená paralyzujícím efektem chladu na arterioly. Bude to podobně platit i pro hlouběji uložené cévy, pokud klesne teplota opravdu hodně (Keatinge and Evans 1961, Hayward and Keatinge 1979). Pod teplotou 34°C je nárůst mortality signifikantní (Hildebrand et al. 2004) a pod teplotou 32°C je vystavení organismu již spojeno se 100% úmrtností.



**Obrázek 7: Schematické znázornění poklesu teploty tělesného jádra a jeho základní reakce na organismus.**

*Hypotermie je zde rozdělena mírnou (bez výplně), střední (čtvercové šrafování) a silnou (boční šrafování) (upraveno dle Pozos and Danzl 2001).*

Základní fyziologická termoregulace zahrnuje u člověka tři faktory: pocení, vazomotoriku a třes (Hervey 1973). Hypotermie vyvolává třes v kosterním svalstvu, cílem třesu je udržení normální tělní teploty. Tento třes přetrvává, dokud teplota jádra neklesne na teplotu 29-31°C. Jde o třes nedobrovolný a rytmický, frekvence závisí na typu svalu (Hemingway 1963). Nejprve

metabolismus roste díky třesu, ale po zastavení třesové reakce metabolismus klesá až do vyčerpání organismu (Hervey 1973). Dalším účinkem hypotermie je například: změna ve funkci iontových kanálů, zvýšená membránová lipidová stabilita, změna ve vyplavení a vychytávání neurotransmiterů, výlev různých substancí s ochranným efektem na funkci buněčné membrány, zachování hematoencefalitické bariéry a snížený metabolismus (Pozos and Danzl 2001).

Prvotní reakcí na chlad u dýchacího systému je zvýšení frekvence nádechů, hyperventilace (Keatinge and Evans 1961). Brzy však následuje hypoventilace, neboli pokles množství nádechů za minutu (Bigelow et al. 1950). Při teplotě 30°C je snížení až ke čtyřem nádechům za minutu, což vede k zadržování oxidu uhličitého ve tkáních. Velké množství oxidu uhličitého způsobí acidózu. Dále se objevuje snížení pohyblivosti řasinek a bronchiálního sekretu, pokles plicní kompliance, nárůst anatomického i fyziologického plicního mrtvého prostoru, vyšší potenciál pro otok plic, kontraktilní funkce bránice a interkostálních svalů se mění (Pozos and Danzl 2001, Morris et al. 1985).

Ve vylučovací soustavě pocit chladu přináší zprvu zvýšenou potřebu vylučování moči, neboli diurézu a to ještě před poklesem teploty jádra (Hervey 1973, Paton 2001). Jde o reakci na hypervolemii po vazokonstrikci (Hervey 1973) k udržení normálního tlaku na stěnu cév. Obecně je funkce ledvin během hypotermie snížena díky poklesu systémového krevního tlaku. Velmi je redukována i spotřeba kyslíku, ale podobně tomu bude i u jiných orgánů jako jsou játra, mozek, srdce, kůže a kosterní svalstvo. Regulace koncentrace iontů draslíku může být poškozena při hypotermii (Pozos and Danzl 2001).

V zaživacím systému dochází ke snížení motility s poklesem teploty jádra, což dále vede k akutní dilataci žaludku a tlustého střeva. Po snížení srdečního výdeje vlivem chladu buňky jater budou stále schopné metabolizovat, ale nezvládají zpracovávat glukózu (Pozos and Danzl 2001). Celkově mají játra sníženou funkci s klesající teplotou. Z toho důvodu bude zhoršena i schopnost jater metabolizovat, což povede k větší acidóze v těle (Britt et al. 1991).

Chlad nebo hypotermie vyvolává širokou hormonální odpověď na stresovou reakci a hlavní je vyplavení katecholaminů. Tyto hormony dřeně nadledvin stimulují termogenezi (Therminarias and Pellerei 1987). Koncentrace inzulinu se u hypotermních pacientů liší, ale pod 31°C není možná usnadněná difuze glukózy do buněk. Někteří pacienti bývají hyperglykemičtí, ale koncentrace glukózy závisí na metabolickém stavu pacienta a ne na stupni hypotermie (Pozos and Danzl 2001). Proto hyperglykémie může být způsobena poklesem inzulinové aktivity, nárůstem katecholaminem indukované glykogenolýzy, zvýšením sekrece katecholaminů, poklesem jaterní funkce nebo resorpcí glukózy ledvinami (Pozos and Danzl 2001).

Pokles teploty jádra obecně inhibuje funkci imunitního systému. Byly provedeny studie, ve kterých byli lidé vystaveni mírné hypotermii, a v následujících třech týdnech nikdo

neonemocněl. Chlad brání infiltraci imunitních buněk, která vede k vyplavení inflamatorních cytokinů (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ ). Hojení ran je při hypotermních podmínkách zhoršené, což je pravděpodobně dáno vazokonstrikcí snižující parciální tlak kyslíku v tkáni (Sessler et al. 1988, Swan et al. 1953). Jedním vysvětlení pro chladově indukovanou imunosupresi je specifická inhibice imunitních buněk. Bylo zdokumentováno, že zvýšený výlev kortikosteroidů při chladovém stresu má také imunosupresivní efekt (Pozos and Danzl 2001).

Mezi prvotní příznaky hypotermie patří špatné vyslovování, poškození krátkodobé paměti a zhoršení stavu vědomí v centrálním nervovém systému. S dalším poklesem teploty v jádře se začínají objevovat vizuální a sluchové halucinace. Člověk se stává méně společenským, objevují se změny v chování, je obecně pomalejší, při chůzi klopýtá či padá (Hervey 1973). Ztráta vědomí obvykle nastává při teplotě 28-30°C. Dochází i k poklesu rychlosti vedení akčního potenciálu z 30 m/s při 35°C na 12 m/s při 21°C (Pozos and Danzl 2001). Snížení teploty zapříčiní pokles metabolismu mozku. Elektrická aktivita mozku byla sledována na teplotu 34°C, což byla teplota, kdy ještě mozek vykazoval aktivitu (Lanier et al. 1992).

### **2.6.2 Hypotermie v kardiovaskulárním systému**

Obdobně jako v jiných systémech hypotermie silně ovlivní funkce v kardiovaskulárním systému (Bigelow et al. 1950). Chladový stres vyvolává vazokonstrikci periferních cév zprostředkovanou sympatikem, v tomto případě výlevem katecholaminů. Vazokonstrikce způsobí srdeční přetížení a dohromady se zvýšenou myokardiální spotřebou kyslíku vyvolá počáteční srdeční tachykardii. S klesající teplotou se objevuje naopak bradykardie a snížení funkce myokardu, což způsobí nižší srdeční výdej a hypotenzi. Otevírání a zavírání sodíkového kanálu je nižší a taky průchod sodíku je snížen. Tento pokles zapříčiní prodloužení PR a QT intervalu a celkové rozšíření QRS komplexu (Pozos and Danzl 2001).

Variabilita cirkadiální tepové frekvence je mnohem různorodější u mírné hypotermie než u normální teploty, což je pravděpodobně dáno nerovnováhou mezi sympatikem a parasympatikem (MacKenzie et al. 1991). Běžná je snižující se tepová frekvence s depresí teploty, která je následkem snížení spontánní depolarizace buněk pacemakeru (Black et al. 1976, Bigelow et al. 1950). Zpomalení je také zapříčiněno prodloužením systoly a uchováním délky diastoly (Hervey 1973). Kontraktilita myokardu neklesá, pokud se teplota jádra nesníží na 28°C (Morris et al. 1985). Srdeční zastavení se objevuje až při teplotě 21°C (Hildebrand et al. 2004).

Vztah mezi tepovou frekvencí a teplotou se liší u jednotlivých druhů (Clark 1920). Větší srdce bude po snížení teploty hůře organizované než srdce menší (Hervey 1973). Dochází k pomalejší aktivaci a inaktivaci membránového napětí, je ovlivněna i repolarizace srdečního akčního potenciálu. Snížení o 1°C v srdci protáhne cyklus srdečního akčního potenciálu a refrakterní

periodu o 15-20 milisekund (Pozos and Danzl 2001). Vliv hypotermie se liší v síních a v komorách, síně mají vyšší rychlost převodu, ale umí si udržet normální synchronní svalovou kontrakci i při nižších teplotách. Na chlad jsou tedy mnohem citlivější komory, což se může projevit inhibicí nebo nepravidelností (Pozos and Danzl 2001).

Při teplotě pod 32°C se objevují síňové i komorové arytmie, u síní na to navazuje rozšíření síní a u komor vzniká primárně fibrilace (Nesemann et al. 1983). Nicméně arytmie vyvolaná hypotermií není potvrzená (Janse and Wit 1989, Wong 1983). Defekty vzniklé při generování elektrického impulsu se objevují mnohem častěji u hypertermie a naopak u hypotermie jsou vzácné. Na druhou stranu chybná propagace impulsu se může objevit jak u hypotermie, tak i u hypertermie. Tyto defekty vedou ke vzniku arytmií (Vostarek et al. 2016). Hyperkalemie může být jednou z příčin srdeční arytmie, což je obvykle osudný znak tkáňové hypoxie (Spurr and Barlow 1959). Vlivem snížené teploty se objevuje i síňová fibrilace, která může být vyvolána zpomalením síňového a komorového stahu, rozšířením QRS komplexu při pomalém komorovém stahu, určitý způsob zablokování převodního systému, či posun pacemakeru do dalších částí převodního systému (Somerville 1960).

S hypotermií klesá i funkce buněk. Vlivem zpomaleného krevního oběhu vzniká hypoxie, ta způsobí přepnutí na anaerobní metabolismus a větší zakyselení organismu. Když teplota jádra dosáhne 25°C, tekutina začne přestupovat ven z cévního prostoru a hematokrit naroste o 150% (Haddix et al. 1996), což zhoršuje srdeční výdej. Zároveň při této teplotě 25°C je větší rozpustnost o 33% kyslíku a oxidu uhličitého (Pozos and Danzl 2001). S každým klesnutím o 1°C dochází k nárůstu o 2% v krevní viskozitě (Prakash et al. 1978). Nízká teplota má za následek poškozenou koagulaci, která je způsobená inhibicí enzymových reakcí v koagulační kaskádě (Michelson et al. 1994).

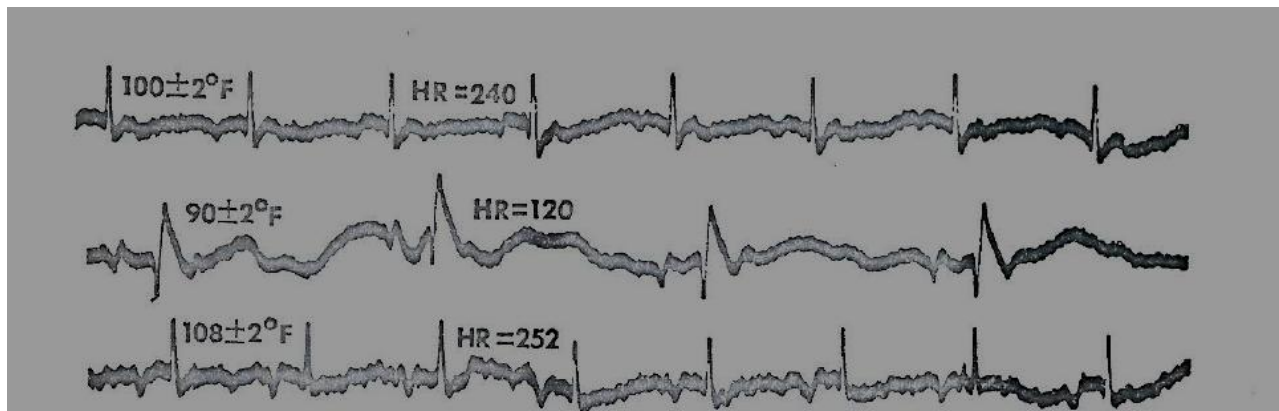
### **2.6.2.1 Vliv hypotermie na růst srdce**

Mnoho fyziologických procesů srdce je velmi ovlivněno teplotou, ve které se srdce nachází. Ptáci, potomci poikilotermů, se díky svým předkům umí vylíhnout i za změněných teplotních podmínek. Warbanow a kol. zjistili, že kuřata inkubována v subnormální teplotě 32-36°C mají sníženou tělesnou hmotnost spojenou s kardiomegalií a nejvíce se to projeví při teplotě 33,5°C (Warbanow 1971, Warbanow 1970). Při hypotermii dochází snížení tepové frekvence, což vede k poklesu srdečního výdeje. Tento deficit je kompenzován nárůstem srdečního objemu (Benson Jr et al. 1989), a to má za následek ono zvětšení srdce. Kardiomegalie může být způsobena buď vyšší buněčnou proliferací, nebo větší velikostí buněk. Současně velikost těla byla výrazně menší u hypotermické inkubace embryí (Warbanow 1971, Warbanow 1970). Při porovnávání velikosti



srdce k tělu, byla hypotermní srdce dvakrát větší vzhledem ke kontrolám. Kontraktilita hypotermního srdce byla také dvakrát větší in vitro, ale in vivo hodnoty vyšly přesně naopak.

Bradykardie a snížené proudění krve při systole ve stádiu HH 17 bylo potvrzeno i v jiné studii (Lee et al. 2011). Například v jiné studii se věnovali hypotermii v časných embryonálních stádiích HH 18-24 při snížené teplotě na 31,1°C. U kuřat klesla srdeční frekvence o 25%, snížil se krevní tlak, průtok krve a zvýšila se vaskulární rezistence (Nakazawa et al. 1986) (Obr. 8).



**Obrázek 8. Elektrokardiogram u experimentálních skupin kuřat inkubovaných v odlišné teplotě.**

*Normotermní skupina (100°F, 37,7°C), hypotermní skupina (90°F, 32°C) a hypertermní skupina (108°F, 42,2°C) (Merkow and Leighton 1967).*

Podobná zjištění byla prezentována v práci Merkow a Leightor. Kuřata byla rozdělena na tři skupiny, ve kterých byla inkubována 90°F, 100°F a 108°F (32°C, 37,7°C a 42,2°C). Hypotermně inkubovaná kuřata (90°F) měla znatelně menší velikost i váhu těla a srdce bylo naopak zvětšené a těžší. Byl zde znatelný projev retardace očí a dalších přívěsků (peří) oproti normálně inkubovaným (100°F) či hypertermním kuřatům (108°F). Hypertermie způsobila zmenšený růst těla i srdce, ale jinak byla morfologicky stejná jako normotermická embrya. Elektrokardiogram byl velmi podobný u normotermních a hypertermních kuřat, zato u hypotermních bylo nespecifické rozšíření QRS komplexu. To bylo podle autorů způsobeno hypertrofickým růstem a navrhuje, že to může být využito jako model srdeční hypertrofie. Hypertrofie může být kompenzací při poklesu efektivity k udržení srdečního výdeje. Množství DNA na srdce bylo shodné u hypotermních i normotermních embryí, jen u hypertermních byly hodnoty nižší. Tepová frekvence byla poloviční u hypotermních ve srovnání s normotermní a hypertermní frekvencí srdce. Myokard u kuřat inkubovaných v 90°F byl velmi podobný ostatním skupinám. V mezibuněčných oblastech se vyskytovalo větší množství vložkovitého či vláknitého materiálu, u kterého předpokládají, že jde o glykogen. (Merkow and Leighton 1967, Merkow and Leighton 1966).

### 3 Cíl práce

Růst v embryonálním období je převážně zajištěn proliferací. Při experimentálních podmínkách se snížením teploty inkubace se zmenšuje velikost těla a zvětšuje velikost srdce.

Hlavním cílem této práce bylo odpovědět na tyto otázky:

- Ovlivní nižší inkubační teplota velikost těla a srdce?
- Pokud dojde k předpokládanému zvětšení srdce, čím je tato změna způsobena na buněčné úrovni: hypertrofií nebo hyperplazií?
- Objeví se rozdíly v tloušťce stěny u obou komor?
- Bude prokazatelný rozdíl mezi Purkyňovými vlákny a pracovními myocyty?
- Změní se velikost Purkyňových vláken po hypotermní inkubaci?

## 4 Experimentální část

### 4.1 Metodika

#### 4.1.1 Pokusný model

V experimentech byla použita vejce bílé Leghornky (Ústav molekulární genetiky AV ČR, Koleč, Česká Republika). Vejce byla nejprve důkladně omyta vodou a drobné pozůstatky špíny byly očištěny kartáčkem, poté byla ještě omyta alkoholem (70% EtOH). Před zahájením experimentu byla vejce uskladněna ve vinotéce (Hyundai Vin18). Zde byla vejce uskladněna tři dny při teplotě 16°C. Byla pravidelně kontrolována teplota a stav vajec. Poté byla přemístěna do inkubátoru (Brinsea, Oya-Easy 380 Advance Series II Cabinet Incubator). V inkubátoru byla předem nastavena vhodná teplota pro inkubaci vajec na  $37,5 \pm 0,5$  °C a vlhkost 40%. V tomto inkubátoru byla vejce inkubována čtyři dny ve tmě. Pravidelně byl monitorován stav vajec a také byla kontrolována teplota a vlhkost inkubátoru. Čtvrtý den byla vejce rozdělena na dvě skupiny: hypotermní model (12 vajec) a kontroly (7 vajec). Při rozdělení do skupin bylo stáří embryí jedenáct dnů. Kontrolní skupina byla přemístěna do jiného inkubátoru (Forma Scientific 3546 Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator With C/hp Lab Oven). V inkubátoru pro kontrolní skupinu byla předem nastavena teplota  $37,5 \pm 0,5$ °C a vlhkost 40%. Druhé skupině v původním inkubátoru byla snížena teplota na 33,5°C a vlhkost 40%. Obě skupiny byly drženy v těchto podmínkách až do doby odběru na sedmnáctém embryonálním dnu (REF Warbanov 1970). Byla prováděna kontrola teploty a vlhkosti dvakrát denně.

#### 4.1.2 Odběr embryí

Sedmnáctý embryonální den byla vejce obou skupin vyjmuta z inkubátoru. Každé vejce bylo postupně otevřeno vystřížením kulatého otvoru v místě vzduchové komůrky. Byla odstraněna papírová blanka (*membrana testa*). Embryo bylo vytaženo háčkem za krček. Poté bylo každé embryo osušeno na papírovém ručníku a zváženo na váhách (Denver Instrument SI-603). Embryo bylo usmrceno ustřížením hlavičky. Dále byl každému embryu otevřen hrudní koš a bylo vyjmuto srdce. Srdce bylo opatrně osušeno a zváženo na analytických váhách (Mettler, Toledo, USA). Poté byla srdce po dobu 48 h fixována v 4% roztoku paraformaldehydu ve fosfátovém pufru (PBS) při teplotě 4 °C. Následně byla srdce třikrát vyprána v PBS po dobu 10 minut. Poté byla odvodněna ve vzestupné alkoholové řadě (viz Tabulka)

odvodnění	doba	odvodnění	doba	odvodnění	doba
30% EtOH*	20 minut	80 % EtOH	20 minut	96% EtOH	15 minut
50% EtOH	20 minut	90% EtOH	20 minut	100% EtOH	15 minut
70% EtOH	20 minut	96% EtOH	15 minut	100% EtOH	15 minut

\*EtOH = alkohol

Po odvodnění byla srdce projasněna v benzenu (třikrát 10 minut). Dále byla srdce prosycena paraplastem I do rozpuštění (přibližně na 30 minut), paraplastem II na 60 minut a na závěr paraplastem III také na 60 minut. Poté byla srdce zalita do kovových zalévacích komůrek, označena a uložena v lednici. Hodnoty vážení byly zaznamenány do tabulky.

#### 4.1.3 Krájení bločků

Kontroly i hypotermní srdce byly po skupinách zality v příslušných bločcích. Poté byly bločky krájeny na rotačním mikrotomu (Leica RH 2135). Jednotlivé řezy o tloušťce 8  $\mu$ m byly přeneseny štětcem na předem připravené sklo s kapkou vody. Řezy byly napnuty přímo na vodní kapce díky vyhřátí ploténky, na níž byla skla umístěna, na teplotu 42°C. Po dostatečném napnutí řezů byla skla z ploténky sejmuta a po zchlazení osušena. Poté byla skla na ploténku vrácena a další 3 hodiny byla ponechána k důkladnému vyschnutí. Přes noc byla skla uložena do inkubátoru (Biological Thermostat BT 120) o teplotě 51°C k úplnému dosušení.

#### 4.1.4 Histologické značení

Jako základní způsob barvení bylo vybráno standardní histologické barvení hemaxylem a eosinem. Hematoxylin je modrofialové bazofilní barvivo, které se váže v jádře buňky. Eosin barví cytoplazmu růžově a je naopak acidofilní. Připravená skla byla nejprve odparafinována v Bioclearu 1, 2, 3 a 4. Do kádinky s Bioclearem byla skla přemístěna vždy na 5 minut. Při přesunu mezi kádinkami Biocleru byla skla lehce osušena. Poté byla skla vložena do sestupné alkoholové řady (100%, 100%, 90%, 80% a 70% EtOH) vždy na 2,5 minuty. Dále byla promyta v destilované vodě po dobu 5 minut. Následovalo barvení hematoxylinem, skla byla ponořena do barviva přibližně na 1 minutu. Poté byla skla prána pod tekoucí kohoutkovou vodou asi 5 minut a dvakrát opláchnuta destilovanou vodou. Barvení skel eosinem bylo aplikováno velmi krátce, přibližně 10 sekund. Poté byla skla omyta v destilované vodě a odvodněna ve vzestupné alkoholové řadě (70%, 80%, 90%, 96%, 100%, 100% EtOH). Potom byla skla projasněna v pětiminutových intervalech karboxylenem, xylenem 1 a 2. Následně byly řezy zamontovány pomocí permanentního média (Depex) a krycího sklíčka. Zamontovaná skla byla do druhého dne ponechána ve tmě v digestoři pro zaschnutí montovacího média.

#### 4.1.5 Imunohistochemická značení

##### 1) *Značení anti-actin ( $\alpha$ -sarcomeric), Rhodamine (TRITC), Wheat Germ Agglutinin a Hoechst*

Dalším způsobem bylo imunohistochemické značení anti-actin ( $\alpha$ -sarcomeric) a wheat germ agglutinin (WGA). Monoklonální myši IgM anti-actin ( $\alpha$ -sarcomeric) protilátka je používána pro studium svalové diferenciace. Je specifická pro kosterní a srdeční isoformu aktinu ( $\alpha$ -SA). WGA Alexa Fluor 488 conjugate je universální značení pro detekci glykokonjugátů v histochemických aplikacích. Váže se převážně na vláknitou složku mimobuněčné hmoty, čímž barví mimo jiné basální membránu.

Nejprve byla skla odparafinována v Bioclearu 1, 2, 3 a 4 vždy po 5 minutách. Poté byla vložena do sestupné alkoholové řady (100%, 100%, 90%, 80% a 70% EtOH) vždy na 2,5 minuty. Skla byla dále promyta v PBS jednou na 5 minut, dvakrát v PBS s 0,5% Tweenem (0,5% PBT) také 5 minut a na konec ještě znovu dvakrát na 5 minut v PBS. Poté byla na skla aplikována předinkubace v normálním kozím séru (normal goat serum, NGS) minimálně na 30 minut. NGS bylo ředěno 1:10 v roztoku 1% hovězího sérového albuminu (bovine serum albumin, BSA) a 0,1% Tween v PBS (0,1% PBT). Poté byla na skla aplikována primární protilátka  $\alpha$ -SA (Sigma-Aldrich A2172) ředěna 1:800 v roztoku NGS v 1%BSA a 0,1% PBT (1:10). Primární protilátka  $\alpha$ -SA byla inkubována na sklech přes noc při 4°C. Poté bylo nezbytné skla důkladně třikrát promýt v PBS po 10 minutách. Poté byla aplikována sekundární kozí protilátka značená rhodaminem namířená proti myším globulinům (Rhodamine (TRITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG+IgM, Jackson Immuno Research Laboratories, 115-025-068). Sekundární protilátka byla ředěna v roztoku NGS v 1%BSA a 0,1% PBT (1:10) v poměru 1:200. Na sklech byla sekundární protilátka inkubována ve tmě 60 minut za pokojové teploty (21-22°C). V dalším kroku bylo ve tmě při pokojové teplotě provedeno značení WGA (Invitrogen 115-025-146) na 60 minut. WGA byl ředěn 1:50 v roztoku 0,2% Tritonu v PBS. Poté byla skla třikrát prána na 10 minut v PBS a jednou 10 minut v destilované vodě. Dále byla jádra dobarvena barvivem Hoechst (Sigma 861405). Hoechst byl ředěn v poměru 1:100 000 v roztoku 0,1% Tritonu v destilované vodě. Hoechst byl aplikován na 10 minut ve tmě při pokojové teplotě. Skla potom byla důkladně omyta destilovanou vodou. Poté byla odvodněna vzestupné alkoholové řadě (70%, 80%, 90%, 96%, 100%, 100% EtOH). Dále byly preparáty projasněny v xylenu 1 a 2 vždy 5 minut. Řezy byly následně zamontovány pomocí permanentního média (Depex) a krycího sklíčka. Tato skla byla do druhého dne ponechána ve tmě v digestoři pro důkladné zaschnutí montovacího média.

##### 2) *Značení Anti-phospho-Histone H3, Cy3 a DRAQ 5*

Druhým způsobem imunohistochemického značení bylo barvení protilátkou anti-phospho-Histone H3 (pHIS 3) a DRAQ 5. Anti-phospho-Histone H3 je králíčí polyklonální protilátka.

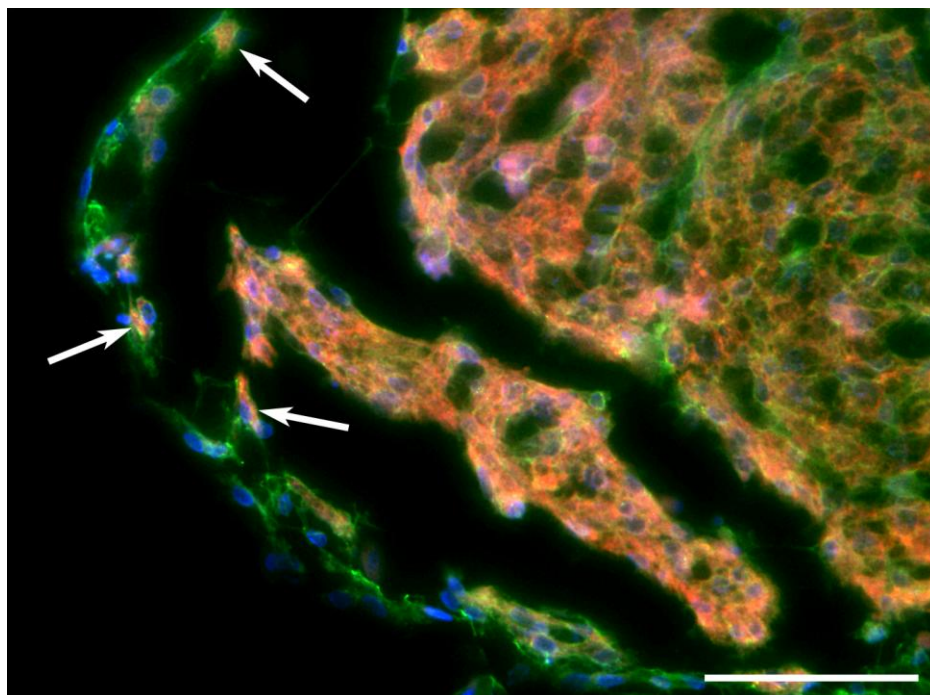
Je schopná detekovat histon H3 fosforylovaný na Serinu 10 v chromatinu eukaryotických buněk. Ten se vyskytuje v jádře buněk nacházejících se v M-fázi buněčného cyklu, a je tedy markerem mitózy. DRAQ 5 je nespecifické barvivo vázající se na DNA živých nebo fixovaných buněk.

První krokem bylo odparafinování skel v Bioclearu 1, 2, 3 a 4 na 5 minut. Poté byla skla postupně ponořena do sestupné alkoholové řady (100%, 100%, 90%, 80% a 70% EtOH) vždy na 2,5 minuty. Dále byla skla promyta v PBS jednou na 5 minut, dvakrát v PBS s 0,5% Tweenem (0,5% PBT) také 5 minut a na konec znovu dvakrát na 5 minut v PBS. Pro odmaskování antigenu bylo nutné skla povařit v 10mM citrátovém pufru s pH 6,00 v mikrovlnné troubě (MW 750 W) dvakrát 5 minut. Pro vychlazení a omytí byla skla ponořena do PBS s 0,1% Tritonem na 10 minut, a pak ještě jednou na 10 minut. Poté byla skla ještě promyta v PBS třikrát 5 minut. Řezy na skle byly ponořeny do roztoku NGS ředěné 1:10 s 0,1% PBT na 90 minut při pokojové teplotě. Dále byla na skla aplikována primární protilátka pHIS3 (Millipore 06-570) ředěná v NGS s 0,1% PBT a inkubována přes noc v lednici (+4°C). Druhý den byla skla třikrát promyta v PBS na 10 minut. Poté byla aplikována sekundární protilátka Cy3 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (JIRL 111-165-003) na 90 minut za pokojové teploty a ve tmě. Sekundární protilátka byla ředěna 1:200 v roztoku NGS s 0,1% PBT (1:10). Dále byla skla promyta třikrát v PBS 5 minut a jednou v destilované vodě také 5 minut. Posledním barvicím krokem byla aplikace DRAQ 5 (LI-COR 928-40022) naředěný 1:1000 v 0,1% PBT. DRAQ 5 byl inkubován 60 minut ve tmě za pokojové teploty. Poté byla skla prána v PBS dvakrát 5 minut a jednou 5 minut v destilované vodě. Dále byla odvodněna vzestupné alkoholové řadě (70%, 80%, 90%, 96%, 100%, 100% EtOH). Skla byla projasněna v xylenu 1 a 2 vždy 5 minut. Řezy byly následně zamontovány pomocí permanentního média (Depex) a krycího sklíčka. Zamontovaná skla byla do druhého dne ponechána pro zaschnutí montovacího média ve tmě v digestoři.

#### 4.1.6 Mikroskopické metody

Pro zobrazení řezů barvených hematoxylinem a eosinem byla použita světelná mikroskopie. Byl použit světelný mikroskop Olympus BX51 s připojeným modulem pro digitální fotografování. Pro snímání fotografií a jejich úpravy byl použit počítačový program Cell<sup>^</sup>P. Nejprve byla nastavena intenzita světla a bylo zkontrolováno využití filtrů. Preparát na podložním skle byl nejprve zaostřen při zvětšení 10x a byla vybrána vhodná oblast. Vždy byla vybírána dvě místa v cirkulární oblasti levé komory (LV circ), pravé komory (RV circ) a dvě oblasti v papilárních svalech levé komory (LV mp). Snímky byly sbírány při zvětšení 20x. Postup byl zopakován u všech plánovaných oblastí stejně. Na závěr byla ještě vyfocena kalibrace pro další potřeby analýzy snímků. Dále zde byly nasbírány snímky stěny pravé a levé komory se zvětšením 2x. Znovu byl postup zopakován u všech oblastí všech řezů kontrolních i hypotermních srdcí.

Purkyňova vlákna byla také snímána na mikroskopu BX51 se zapnutým modulem fluorescence. Pro tvorbu obrazů byl použit znovu program Cell<sup>^</sup>P. Po nastavení mikroskopu byla vybrána vhodná oblast v levé komoře při zvětšení 4x. V každé komoře byla vybrána tři místa bohatá na tato vlákna. Purkyňova vlákna se v kuřecím srdci obvykle vyskytují těsně pod endokardem (Obrázek 9). Vyskytují se samostatně nebo ve skupině s malým počtem. Mají protažený vřetenovitý tvar, v našem případě jde o transverzální řezy Purkyňovými vlákny. Snímky byly sbírány se zvětšením 40x. Postup byl opakován u všech řezů obou skupin.



**Obrázek 9: Ukázka pro metodické zobrazení určování Purkyňových vláken.**

*Snímek levé komory v oblasti papilárních svalů byl vytvořen flourescenčním mikroskopem. Jde o fotografii hypotermního srdce. Zvětšení bylo 40x, měřítko je 50  $\mu$ m.*

Fotografie imunohistochemického značení byly snímány na konfokálním fluorescenčním mikroskopu Olympus BX61, konfokální modul FluoView1000. V našem experimentu byl využit sekundární fluorochrom formou imunohistochemického značení (primární a sekundární protilátka). Snímek byl zaostřen se zvětšením 10x a poté byla vybrána cílová oblast, kam byla aplikována kapka imerzního oleje. Cílové oblasti byly stejné jako u světelného mikroskopu (LV circ, LV mp a RV circ). Dva snímky z každé oblasti byly fotografovány se zvětšením 40x. Při zapnutém laseru byla při autofluorescenci nastavena hloubka snímané oblasti (6  $\mu$ m, 4 optické řezy s z-krokem 1,5  $\mu$ m), intenzita laseru, přiblížení a poměr obrazu. U každého typu laserového záření byla poté upravena jeho intenzita. Tento postup byl zopakován u všech oblastí.

#### 4.1.7 Analýza snímků

Nasnímané obrázky ze světelného a fluorescenčního mikroskopu BX51 byly vyhodnoceny v programu ImageJ - win64 (FIJI). Díky tomuto programu byla měřena tloušťka kardiomyocytů přes jádro v pixelech. V každém snímku bylo změřeno maximum buněk s jádrem a jasně definovanou buněčnou membránou. Hodnoty naměřené na jednom snímku byly přeneseny do tabulky v Excelu Microsoft Office. Tento postup byl zopakován u všech pořízených fotografií. Měření šířky stěn komor byl velmi obdobný. Stěny byly měřeny pomocí programu ImageJ - win64 (FIJI) v pixelech. Byly vybrány tři oblasti v každé stěně pravé a levé komory u každého srdce. Poté byly hodnoty vloženy do tabulky Excel Microsoft Office. Buňky převodního systému – Purkyňova vlákna byla také měřena v pixelech v programu ImageJ - win64 (FIJI). Na každém snímku byl změřen maximální počet jasně definovatelných Purkyňových vláken. Naměřené hodnoty byly přesunuty do tabulky Excel Microsoft Office. Všechny získané hodnoty byly převedeny z pixelů na  $\mu\text{m}$ .

Fotografie se značením  $\alpha$ -SA a WGA byly také vyhodnoceny v programu ImageJ – win64 (FIJI). Cílem bylo také změření tloušťky kardiomyocytů přes jádro. Opakování tohoto postupu bylo dáno v některých případech nejasně definovanou plazmatickou membránou po barvení hematoxylinem a eosinem. Znovu bylo v každém snímku změřeno maximum buněk s jasným jádrem a buněčnou membránou. Hodnoty byly uloženy do tabulky v Excelu Microsoft Office. Opět tento postup byl zopakován u všech snímků. Poté byly hodnoty převedeny na  $\mu\text{m}$ .

Nasbírané fotografie se značením pHIS 3 a DRAQ 5 byly analyzovány v programech Adobe Photoshop 7.0 a ImageJ – win64 (FIJI). Nejprve byla v programu Photoshop označena pozitivní jádra (tj. proliferující buňky). Poté byla zkontrolována pozitivita vyskytující se v místě jádra přepnutím jednotlivých kanálů. Počet pozitivních jader byl přenesen do ImageJ, kde byla spočítána. Hodnota byla uložena do tabulky Excel Microsoft Office. Dále byl vytvořen obraz plochy ve Photoshopu a poté byl přenesen do ImageJ. Zde byla plocha změřena a uložena do tabulky v Excelu. Stejný postup byl zopakován u všech nasnímaných fotografií.

#### 4.1.8 Statistické vyhodnocení

Nasbíraná data byla rozdělena na dvě skupiny podle typu inkubace. Normotermně inkubovaných embryí bylo 7 a do hypotermní skupiny bylo zapojeno 12 embryí. Hodnoty jsou prezentovány ve výsledcích jako aritmetický průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Poměr hmotnosti srdce a těla byl počítán  $\text{HW/BW} \times 100$  ( $\text{HW}$  = hmotnost srdce [g],  $\text{BW}$  = hmotnost těla[g]). Signifikantnost výsledků byla kontrolována pomocí Studentova t-testu a hodnoty statisticky významné byly označeny hvězdičkou s vysvětlením v legendě (\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ ). Korelační koeficient byl proveden vynesáním grafu s lineární spojnici trendu,



rovnice regrese a hodnotou spolehlivosti R. Tuto hodnotu spolehlivosti hodnotíme jako malou ( $R = 0,1$ ), střední ( $R = 0,3$ ) a velkou ( $R = 0,5$ ).

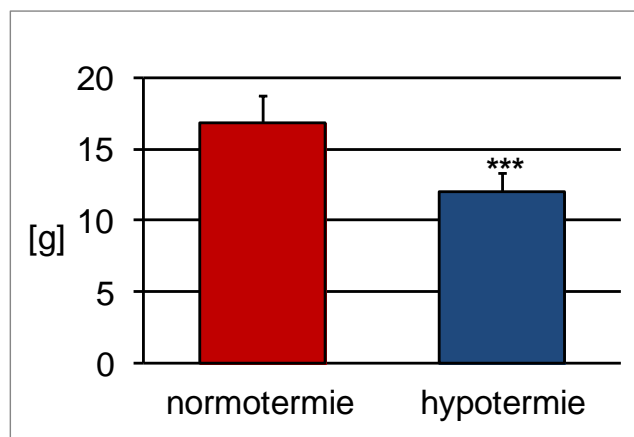
## 4.2 Výsledky

Výsledky byly organizovány do skupin dle sbírání dat a jejich následné analýzy:

- 4.2.1 Hodnoty hmotnosti těla a srdce, poměr váhy srdce a těla
- 4.2.2 Šíře buněk po značení hematoxylinem a eosinem a  $\alpha$ -sarkomerickým aktinem
- 4.2.3 Šíře stěny levé a pravé komory
- 4.2.4 Hodnoty příčného průměru Purkyňových vláken
- 4.2.5 Množství proliferujících kardiomyocytů v  $1 \text{ mm}^3$  tkáně

### 4.2.1 Hmotnost těla a srdce

První skupina ( $n=7$ ) s kuřecími embryi byla inkubována za standardních podmínek – normotermie ( $37,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). V druhé skupině ( $n=12$ ) byla vejce s embryi kuřete ponechána v hypotermní teplotě ( $33,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Hypotermní embrya byla po vytažení z vejce viditelně menšího vzrůstu než kontroly. Tomuto faktu odpovídala i hmotnost těla po zvážení všech embryí (Graf 1). Průměrná váha normotermních embryí byla  $16,88 \pm 1,86 \text{ g}$ , u hypotermního modelu byla hmotnost  $11,98 \pm 1,26 \text{ g}$ . Hmotnost u normotermních embryí byla větší o 29% než u hypotermních. Dle Studentova T-testu byla hodnota tohoto rozdílu velmi statisticky významná ( $P < 0,001$ ).

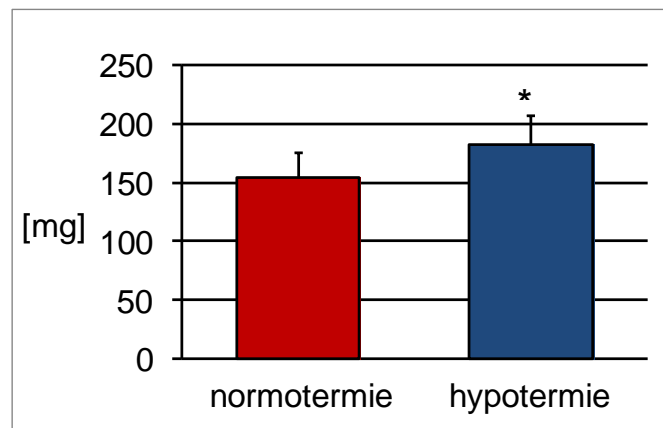


**Graf 1: Průměrná hmotnost těla kuřecích embryí u kontrolní skupiny (červeně) a u experimentální skupiny (modře) s inkubací v hypotermních podmínkách.**

*Kontrolní skupina byla v průměru větší o 29% než hypotermní. (Studentův t-test ( $P < 0,001$ ))*

Po vyjmutí srdcí jsme pozorovali rozdíl mezi skupinami a srdce hypotermních embryí byla znatelně větší. Toto pozorování bylo potvrzeno i zvážením srdcí u obou skupin (Graf 2). Hmotnost srdce u normotermních embryí byla  $154,14 \pm 21,17 \text{ mg}$  a oproti tomu průměrná váha srdce

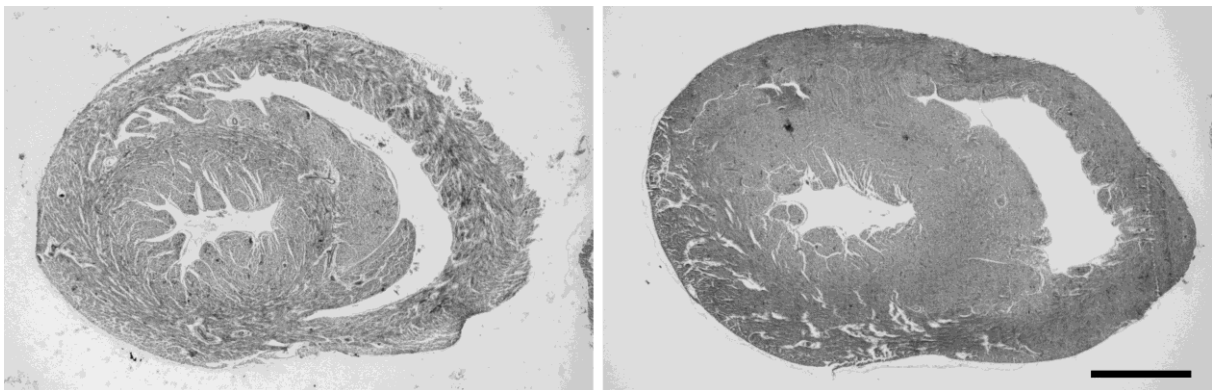
hypotermního modelu byla  $182,10 \pm 24,70$  mg. Zde se hmotnost srdcí lišila o 18% a podle Studentova T-testu je výsledek signifikantní ( $P < 0,05$ ).



**Graf 2: Průměrná váha srdce embryí u normotermní skupiny (červeně) a u hypotermní skupiny (modře).**

*Hmotnost byla o 18% větší u hypotermního modelu než u kontrol. (Studentův t-test,  $*P < 0,05$ ).*

Na obrázku 10 je viditelný mírný rozdíl ve velikosti srdce, který ukazuje větší velikost srdce u hypotermních embryí ve srovnání s kontrolami.



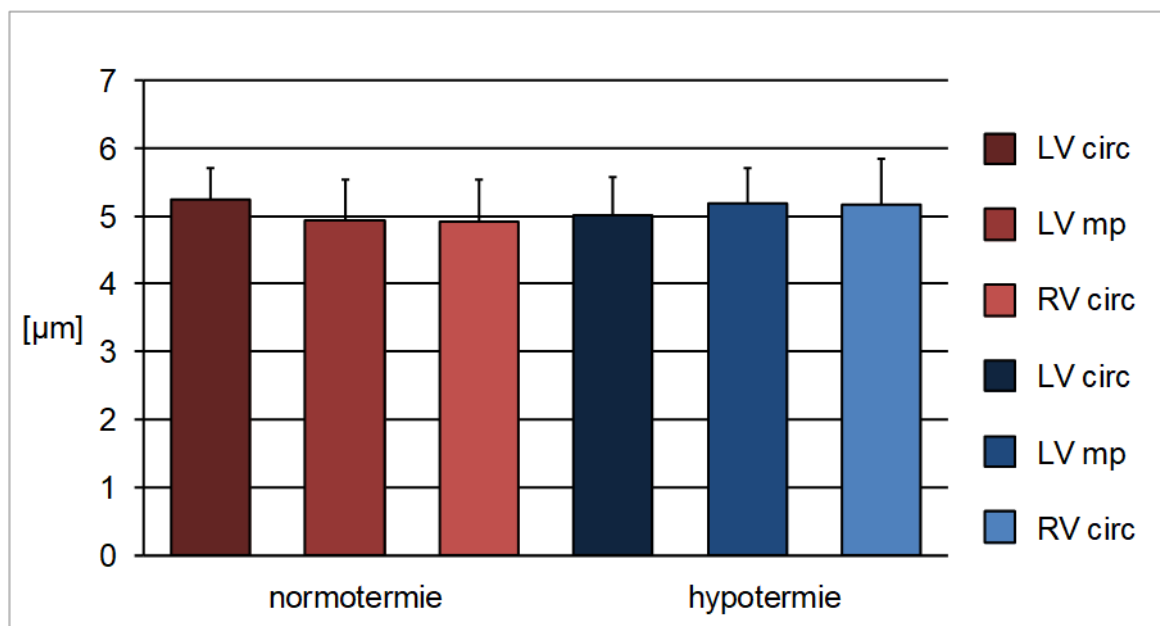
**Obrázek 10: Transverzální řez srdcem u kontrol (vlevo) a experimentálního modelu (vpravo).**

*Vlivem hypotermie dochází k zbytnění srdce (měřítko 1 mm), značení hematoxylin a eosin.*

Dále jsme srovnávali poměr váhy srdce (g) k hmotnosti těla (g). U kontrolní skupiny byl  $9,13 \pm 0,07$  a u experimentální skupiny byl  $1,525 \pm 0,17$ . Tento poměr byl významně větší (o 67%) u hypotermních embryí ( $P < 0,001$ ).

#### 4.2.2 Šíře kardiomyocytů ve vybraných oblastech

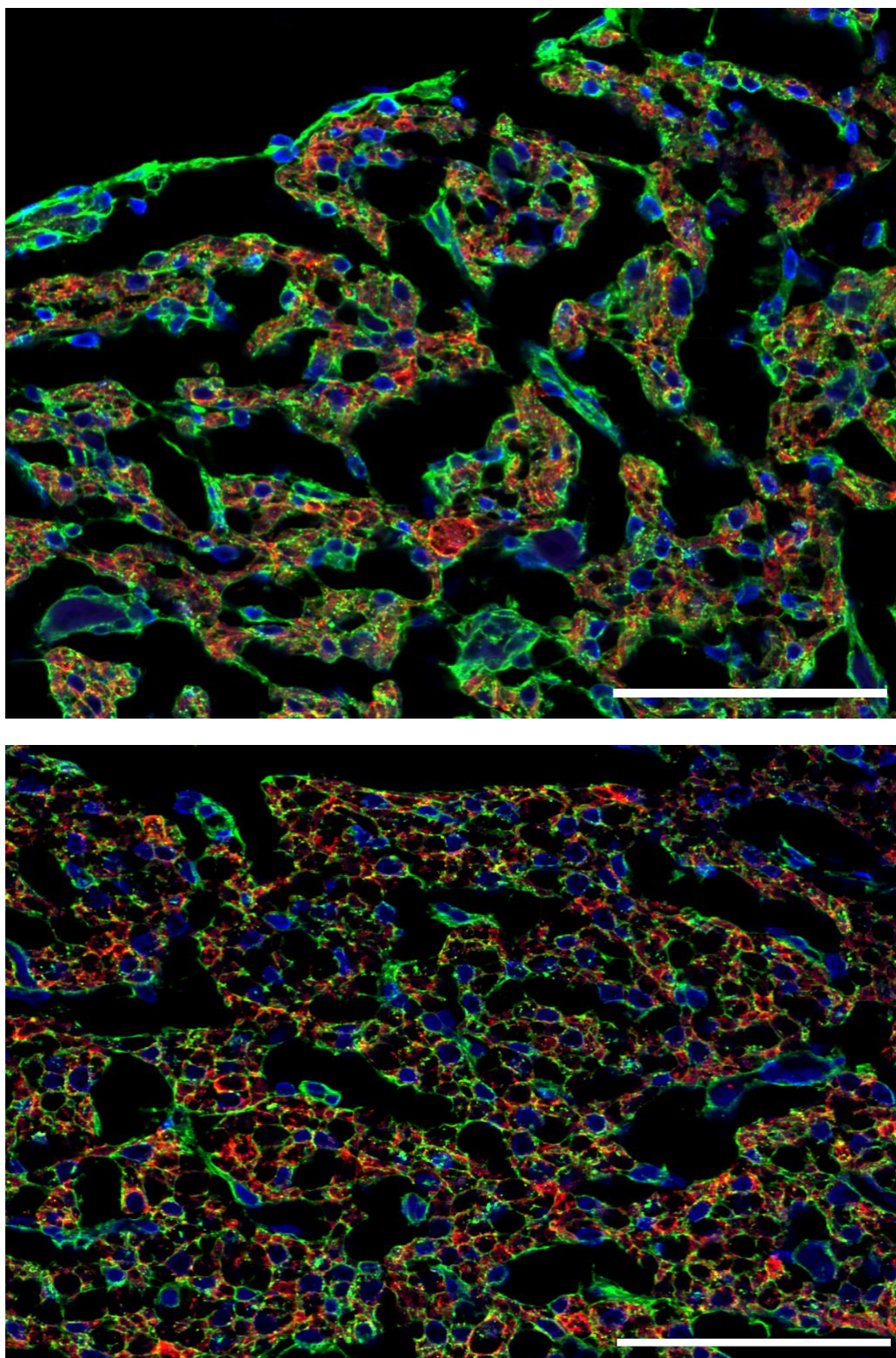
Po barvení hematoxylinem a eosinem vyšly hodnoty mezi jednotlivými oblastmi velmi podobně (Graf 3). Vybranými oblastmi byly střední cirkulární vrstva v levé a pravé komoře a papilární svaly v levé komoře. Tento způsob měření nebyl aplikovatelný u všech oblastí, proto byl tento krok opakován s imunohistochemickým značením. Ve většině případů bylo velmi obtížné přesně definovat stěnu buněk. Některé oblasti nebyly změřeny vůbec, zde je uveden pouze průměr ze získaných zón.



**Graf 3: Zprůměrované hodnoty měření šíře buněk u kontrol a experimentální skupiny po barvení hematoxylinem a eosinem.**

*Hodnoty jsou zde velmi vyrovnané u obou skupin v rámci skupin. Měření nebylo získáno u všech původně vybraných oblastí.*

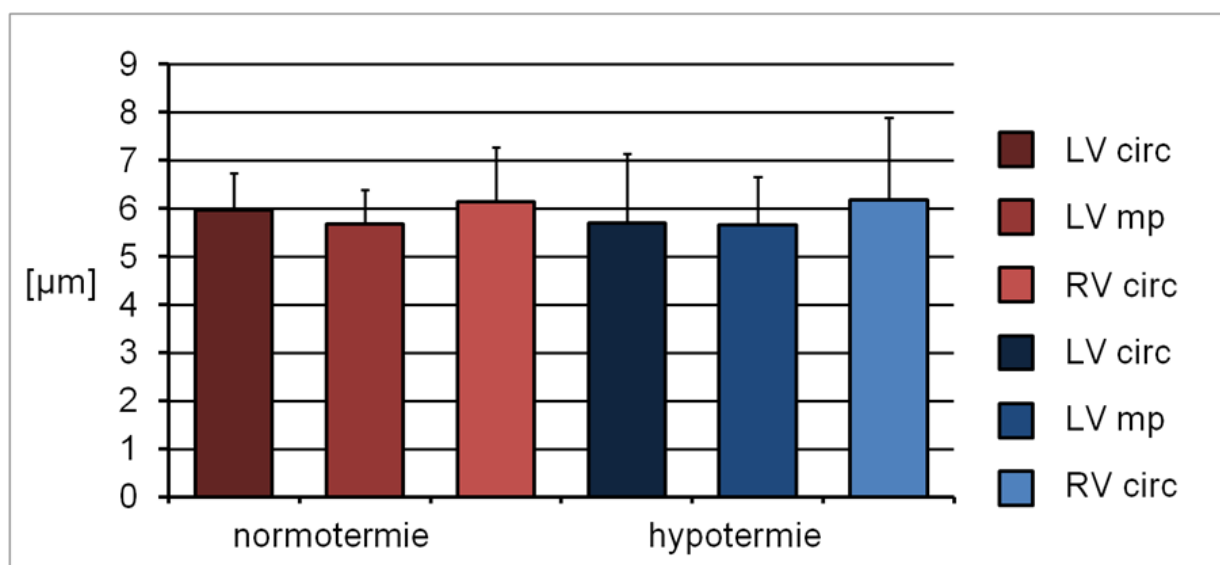
Po imunohistochemickým značení  $\alpha$ -sarkomerickým aktinem a WGA bylo mnohem snadnější určit přesně hranice buňky (Obrázek 11). Mezi oblasti našeho zájmu opět patřila cirkulární oblast levé a pravé komory, papilární svaly levé komory.



**Obrázek 11: Příklady obrázků z konfokálního fluorescenčního mikroskopu po značení  $\alpha$ -SA a WGA.**

*Nahoře je obrázek s normotermickými kardiomyocyty v papilárních svalech levé komory a na obrázku dole je stejná oblast z hypotermního modelu. Mezi velikostí buněk, jak u normotermie tak i u hypotermie, nejsou velké rozdíly. Měřítko je 50  $\mu$ m.*

Hodnoty po tomto způsobu značení byly opět v podstatě srovnatelné (Graf 4). Obecně byla naměřena relativně největší šíře buněk v cirkulární oblasti pravé komory u obou skupin. Naopak poměrně nejmenší buňky byly naměřeny v zóně papilárních svalů levé komory opět u obou skupin. Nicméně rozdíly mezi papilárními svaly a cirkulární oblastí v levé komoře byly sice minimální, ale více výrazné u hypotermního modelu. U hypotermních embryí byl větší rozptyl hodnot šíře kardiomyocytů, čemuž odpovídá i vyšší hodnota směrodatné odchylky. Průměrná hodnota směrodatné odchylky se u hypotermních embryí rovná jedné čtvrtině naměřených hodnot šíře buněk. Tyto výsledky nás vedly k hypotéze, že zvětšená velikost srdce indukovaná hypotermií není pravděpodobně způsobena pouze hypertrofickým růstem buněk, byť určitou úlohu mít bude.

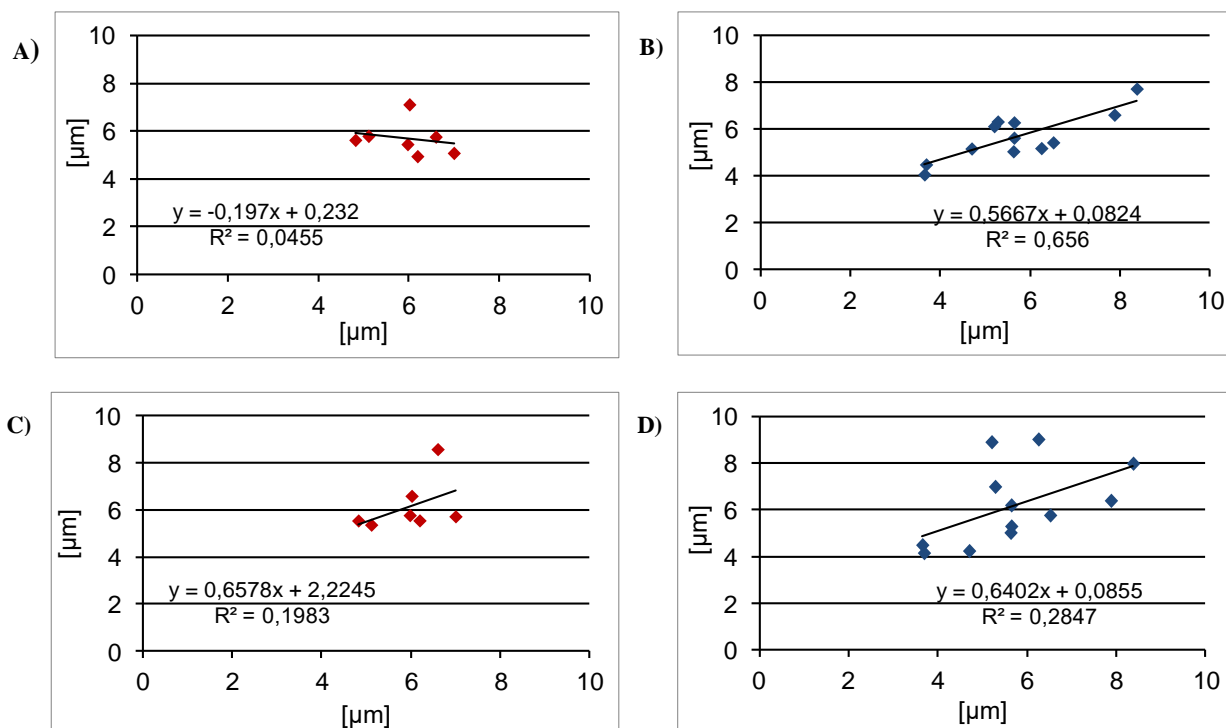


**Graf 4: Naměřené hodnoty šíře buněk u normotermicky a hypotermicky inkubované skupiny po imunohistochemickém značení.**

*Průměrné hodnoty jsou u obou skupin srovnatelné. Větší rozptyl byl pozorován u hypotermní skupiny, což naznačuje větší směrodatná odchylka.*

Tento předpoklad potvrzují i následující grafy (Graf 5). Grafy většinou vykazují pozitivní korelaci mezi naměřenými hodnotami příčného průměru buněk vždy u dvou zvolených oblastí. Potvrzuje to hypotézu, že pokud jsou buňky v jedné oblasti větší, budou větší i v jiné oblasti. To znamená, že jistý podíl na zvětšení srdce bude mít hypertrofický růst.

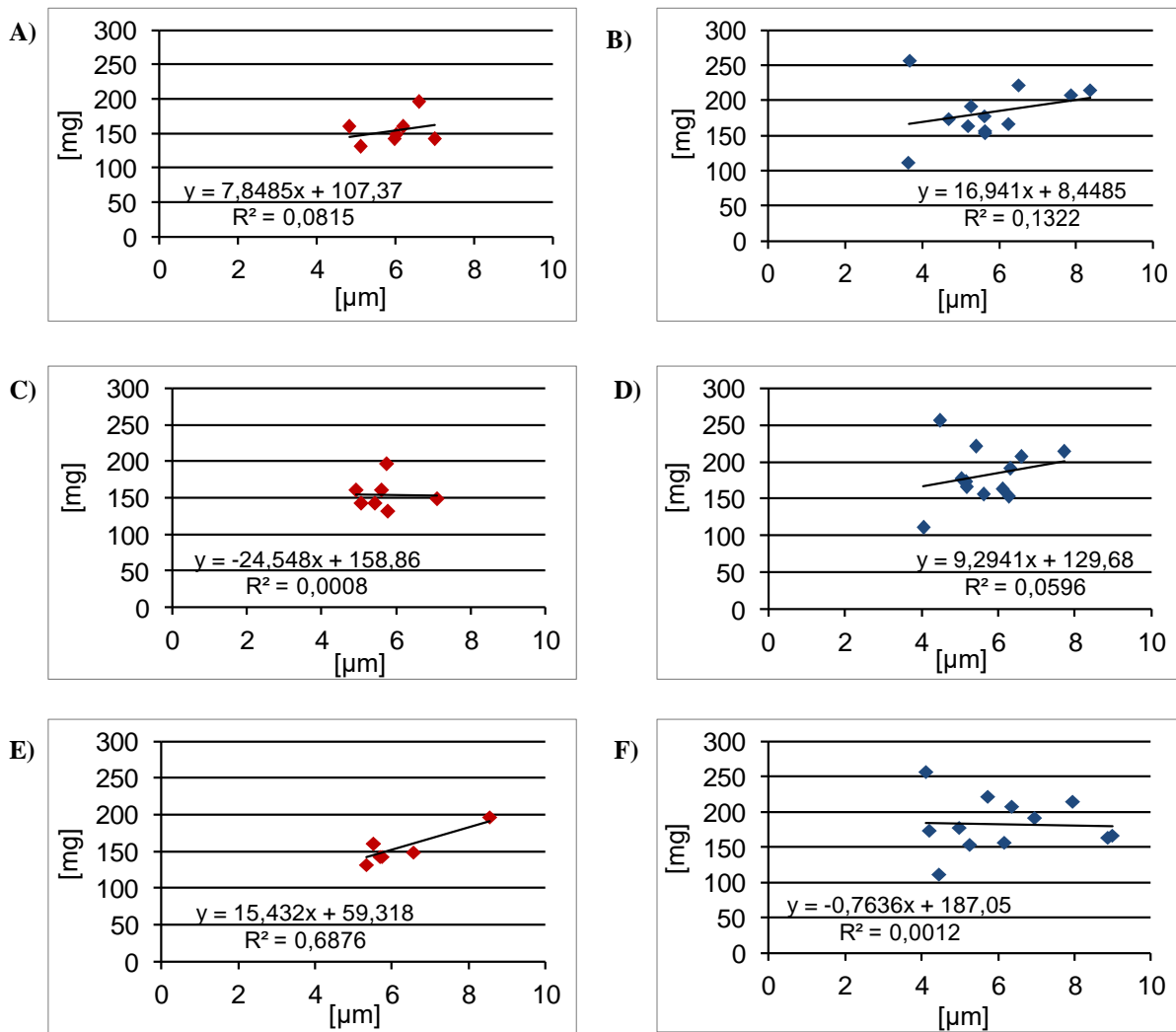




**Graf 5: Koeficient korelace mezi jednotlivými oblastmi.**

**A)** Vlevo nahoře je srovnání cirkulární oblasti proti papilárním svalům v levé komoře u kontrol. **B)** Vpravo nahoře je porovnání cirkulární oblasti a papilárních svalů levé komory u experimentálních embryí. **C)** Korelace mezi cirkulární oblastí levé a pravé komory u normotermie. **D)** Srovnání cirkulární oblasti levé a pravé komory u hypotermie.

Podobně vyšly grafy, kde je srovnávána cílová oblast proti hmotnosti srdce. Vždy byla vynesena korelace mezi papilárními svaly levé komory a cirkulární vrstvou u pravé i levé komory obou skupin vůči hmotnosti. Ve většině grafů byl pozitivní trend naznačující hypertrofii jako možný mechanismus zvětšení srdce. Tato tendence ukazuje, že větší buňky se budou spíše vyskytovat ve váhově větším srdci. Nepřímá závislost se objevuje ve dvou případech: papilární svaly kontrol v levé komoře a cirkulární oblast hypotermního modelu pravé komory. Tento fakt značí nezávislost mezi velikostí příčného průměru buněk a váhou srdce. Téměř ve všech případech je významnost efektu malá. V jednom případě u kontrol, cirkulární oblast pravé komory proti váze srdce, byl efekt veliký a to bylo dáno jednou vyčnívající hodnotou korelace.

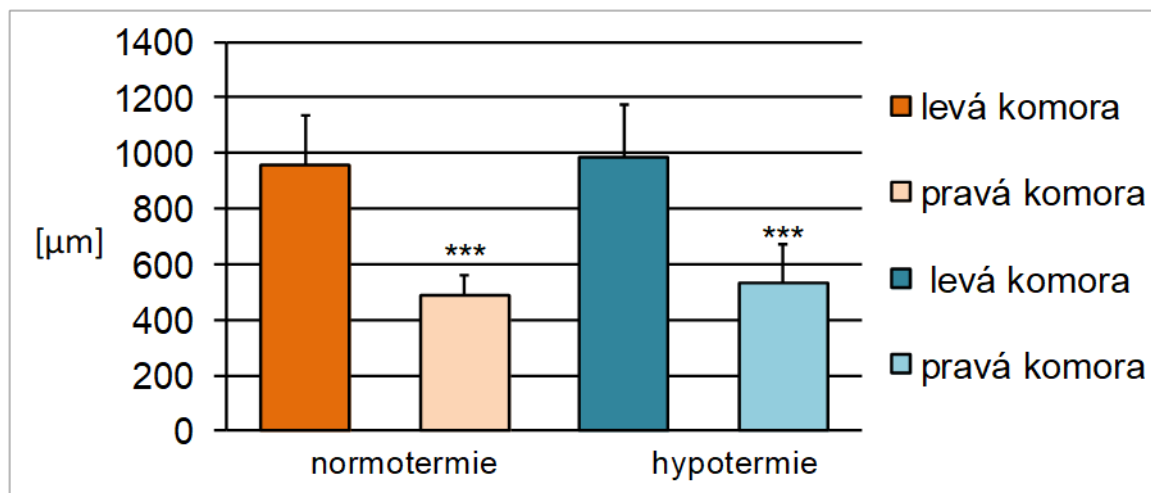


**Graf 6: Srovnání jednotlivých oblastí vůči hmotnosti srdce.**

Obecně pozitivní trend naznačující podíl hypertrofie. **A)** Cirkulární oblast levé komory proti hmotnosti srdce u kontrol. **B)** Levá komora v cirkulární zóně vůči váze srdce u experimentálního modelu. **C)** Papilární svaly levé komory proti hmotnosti srdce u normotermie. **D)** Papilární svaly v levé komoře vůči váze srdce u hypotermie. **E)** Pravá komora v cirkulární oblasti vůči hmotnosti srdce u normotermicky inkubovaných kuřat. **F)** Cirkulární zóna v pravé komoře proti váze srdce u hypotermních embryí.

### 4.2.3 Šíře stěny komor

Měření stěny levé a pravé komory ukázalo opět obdobné výsledky mezi skupinami (Graf 7). Tloušťka stěny levé komory byla přibližně dvakrát větší než v pravé komoře u obou skupin (Studentův t-test,  $P < 0,001$ ) U levé i pravé hypotermní komory jsou hodnoty lehce byt' statisticky nevýznamně zvýšené oproti kontrolám, což jen potvrzuje kardiomegalii po hypotermní inkubaci. Hodnoty směrodatné odchylky u hypotermie jsou poněkud vyšší. Toto odpovídá většímu rozptylu naměřených hodnot.



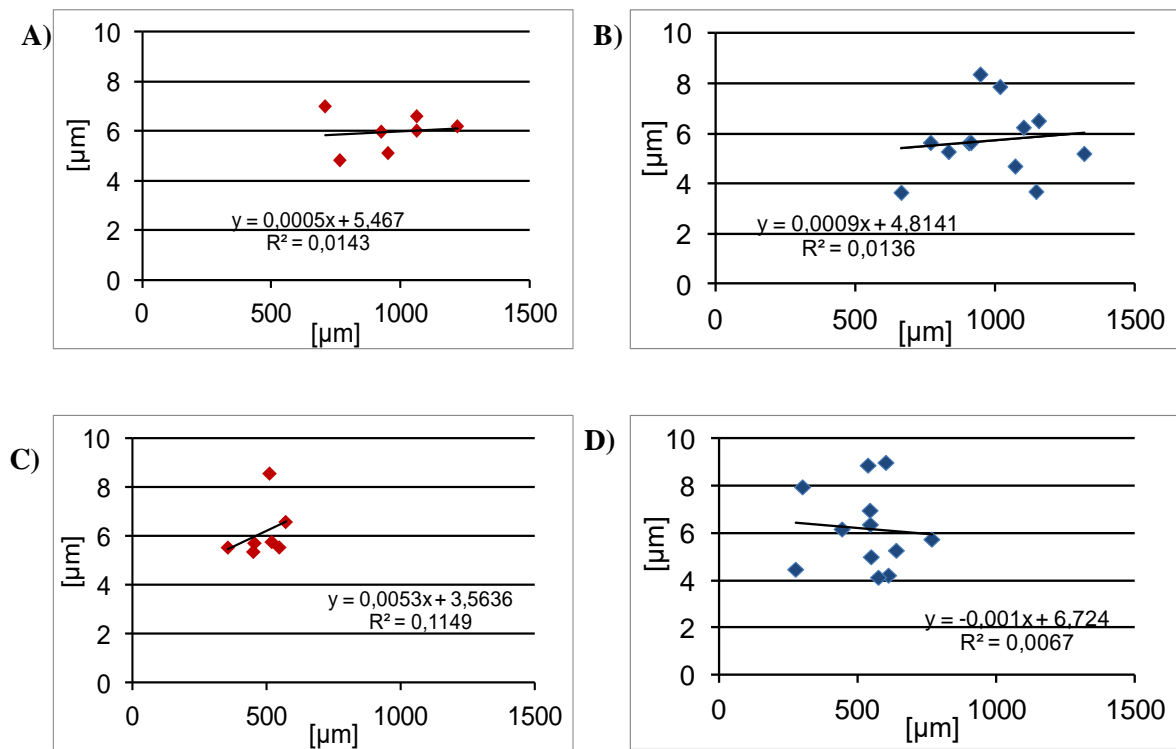
**Graf 7: Naměřené hodnoty tloušťky stěny levé a pravé komory u normotermie a hypotermie.**

*Levá komora je u obou skupin prokazatelně téměř dvakrát větší (Studentův t-test, \*\*\*  $P < 0,001$ ).*

*Naměřená velikost stěn u kuřat inkubovaných v hypotermii je lehce vyšší než u kontrol.*

Korelace mezi velikostí buněk a šířkou stěny komor měla ve většině případů pozitivní trend. Tento trend opět naznačuje jistou míru hypertrofie, v širší stěně budou i větší buňky. Nepřímá závislost se objevila v jednom případě – příčný průměr buněk cirkulární oblast pravé komory proti šíři pravé komory u hypotermických srdcí. Ve všech případech však byla hodnota spolehlivosti korelačního koeficientu malá.



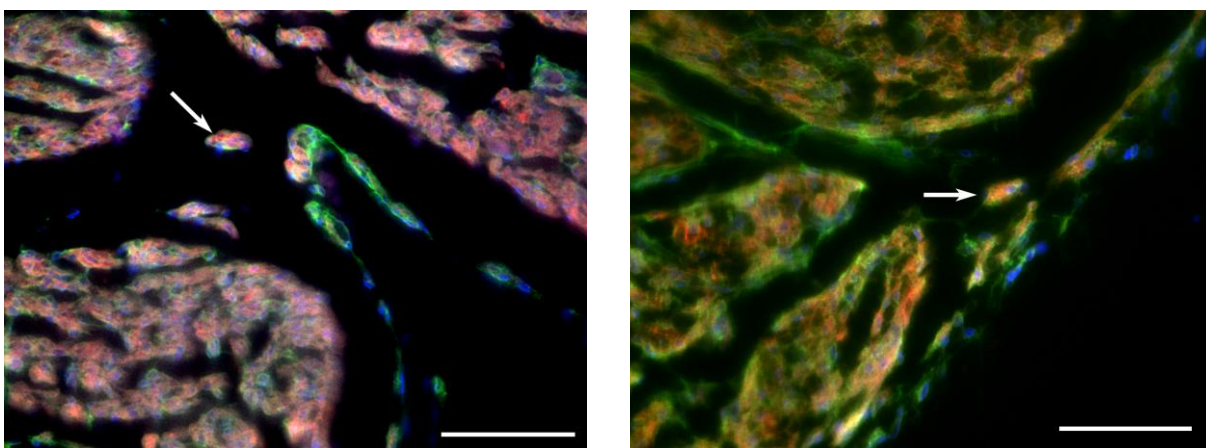


**Graf 8: Srovnání velikosti buněk proti šířce stěny komor.**

Hodnota spolehlivosti  $R$  je ve všech případech malá. **A)** Cirkulární oblast levé komory proti šíři levé komory u normotermie. **B)** Cirkulární vrstva levé komory vůči tloušťce levé komory u hypotermie. **C)** Cirkulární zóna levé komory proti šířce pravé komory. **D)** Cirkulární oblast pravé komory vůči šíři pravé komory.

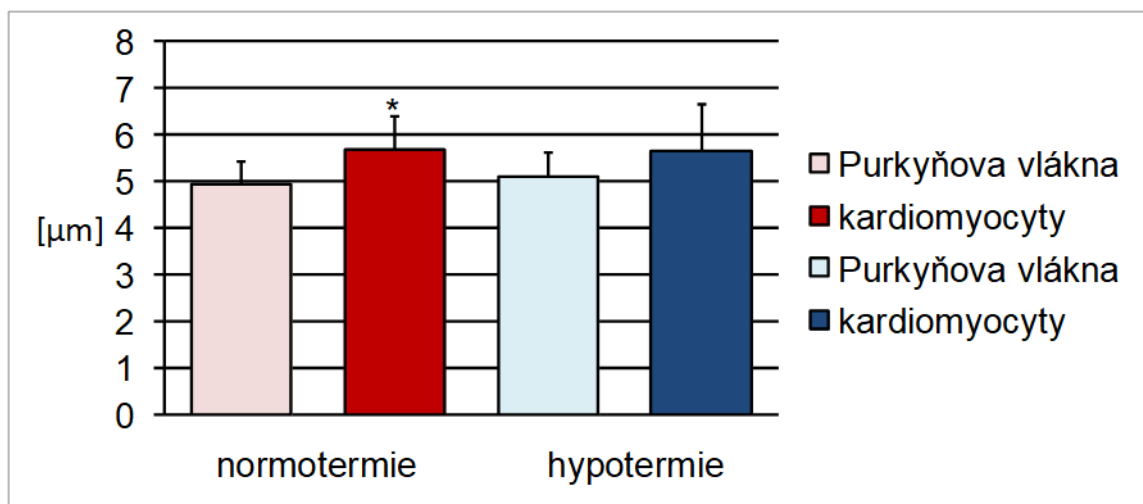
#### 4.2.4 Příčný průměr Purkyňových vláken

Hodnoty měření příčného průměru Purkyňových vláken v subendokardiu levé komory byly u obou skupin velmi podobné (Obrázek 12). Velikost Purkyňových vláken u kontrol byla  $4,93 \pm 0,49 \mu\text{m}$  a u hypotermních embryí byla průměrná hodnota  $5,11 \pm 0,51 \mu\text{m}$  (Graf 9). Hodnota šířky hypotermních Purkyňových vláken byla lehce větší než u normotermní skupiny, nicméně rozdíl nebyl signifikantní. Ve srovnání s pracovními kardiomyocyty stejné oblasti byla Purkyňova vlákna menší u obou skupin. V případě normotermie byl rozdíl ve velikosti signifikantní (párový Studentův t-test,  $* P < 0,05$ ).



**Obrázek 12: Ukázka Purkyňových vláken v řezu.**

*Obrázek vlevo je z normotermního řezu, vpravo je vidět snímek řezu hypotermického modelu. Měřítka je  $50 \mu\text{m}$ .*

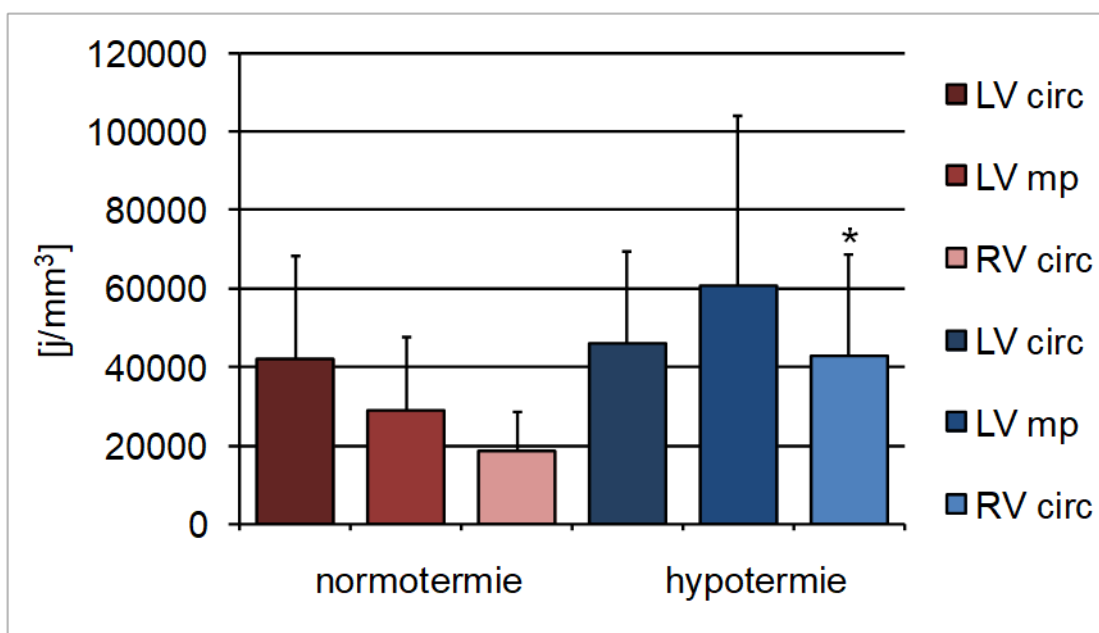


**Graf 9: Srovnání průměrné velikosti příčného průměru Purkyňových vláken a kardiomyocytů u normotermie a hypotermie.**

*Purkyňova vlákna jsou menší než kardiomyocyty, u normotermie je rozdíl signifikantní (Studentův t-test,  $* P < 0,05$ )*

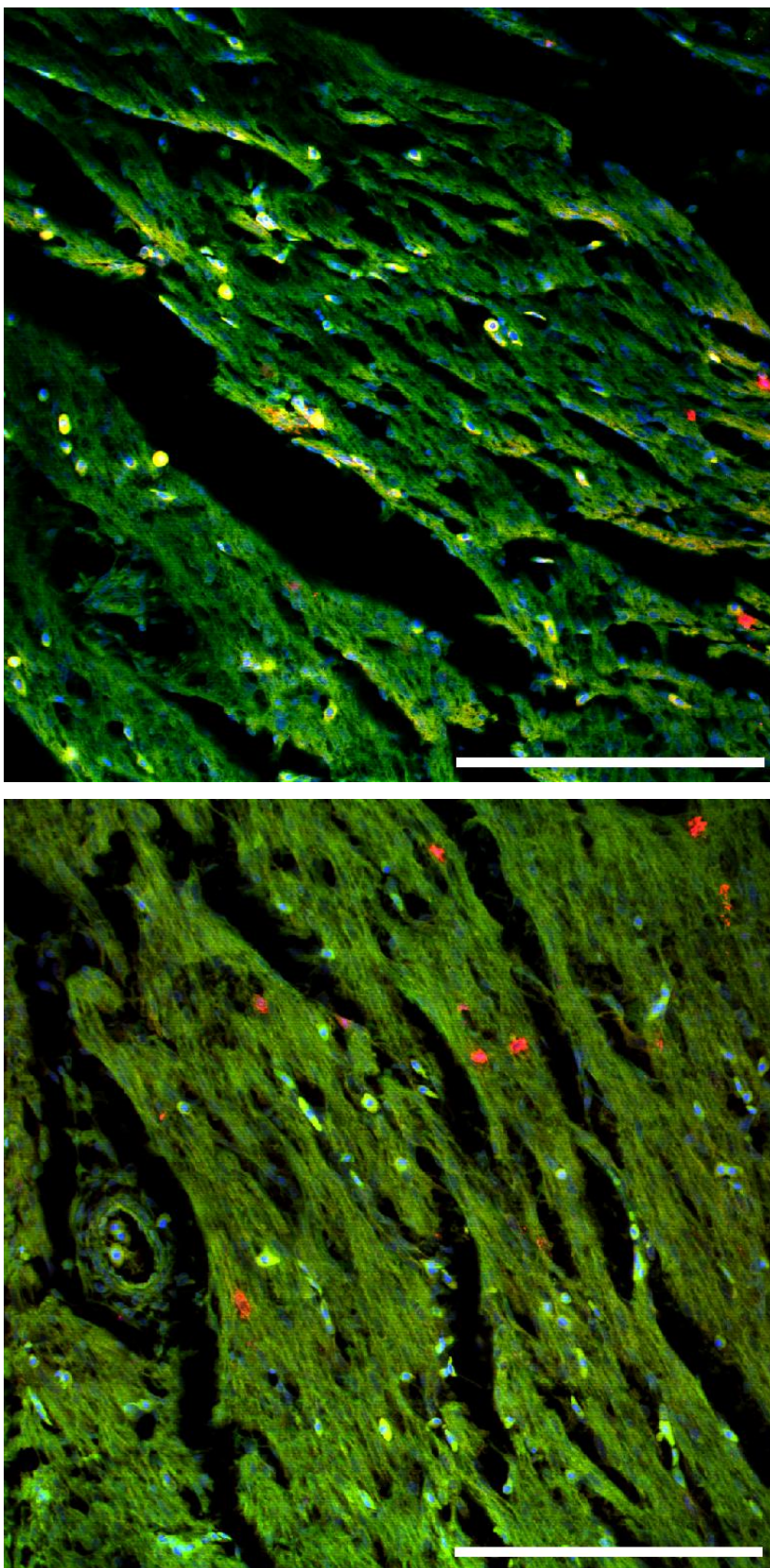
#### 4.2.5 Proliferace v kardiomyocytech

Podíl hyperplazie na zvětšení srdce u hypotermních embryí proti kontrolám byl kontrolován pomocí imunohistochemického značení pHIS3. Tento jaderný marker se váže jen na fosforylovaný histon 3 při buněčném dělení (mitóze). V každém snímku byl zjištěn počet pozitivních buněk a plocha, která byla přepočítána na objem. Hodnoty uvedené v této sekci jsou podíly počtu proliferujících jader a objemu spočítaného z plochy snímku. Podle výsledků byla výrazně větší proliferace v hypotermních kardiomyocytech než v buňkách po normotermní inkubaci (Graf 10). V papilárních svalech levé komory a cirkulární vrstvy pravé komory byly hodnoty dokonce dvojnásobné v experimentálním modelu. V pravé komoře cirkulární oblasti byly hodnoty statisticky významné (Studentův t-test,  $P < 0,05$ ). Celkově byly u obou skupin nejnižší hodnoty proliferace v cirkulární zóně pravé komory. Velikost směrodatné odchylky je zde výrazná, což je dáno přepočtem plochy a poté i objemu. Oblast s proliferujícími buňkami byla cíleně vybírána na konfokálním fluorescenčním mikroskopu a počet těchto buněk v rámci snímku byl vždy podobný vzhledem k typu inkubace. Průměrná četnost napočítaných pozitivních buněk na snímek byla u kontrol  $9 \pm 5$  a u hypotermie  $17 \pm 10$  kardiomyocytů (Obrázek 13). Vždy se velmi lišila plocha a s tím také objem.



**Graf 10: Porovnání množství proliferujících buněk v  $1\text{mm}^3$  tkáně u normotermie a u hypotermie.**

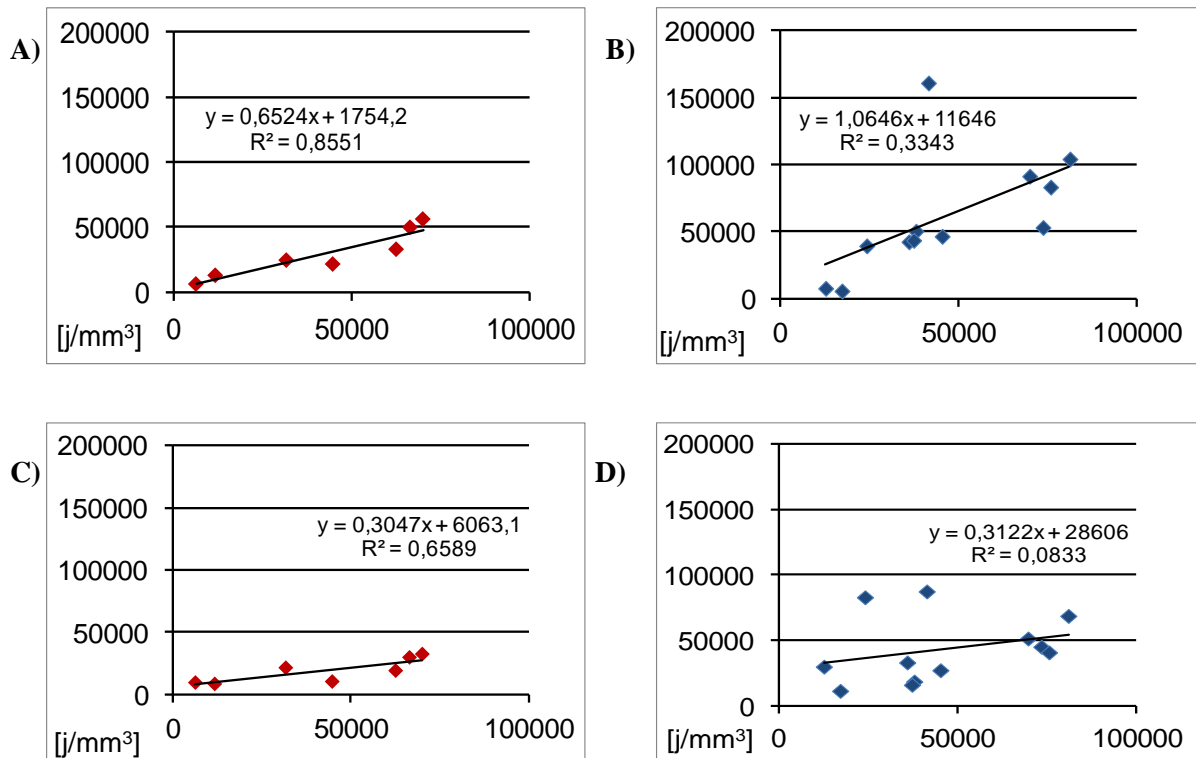
*V papilárních svalech levé komory a cirkulární zóně pravé komory jsou hodnoty zdvojnásobené u hypotermie, v oblasti pravé komory je výsledek signifikantní (\*  $P < 0,05$ , Studentův t-test).*



**Obrázek 13: Příklad snímků z konfokálního fluorescenčního mikroskopu po značení pHIS 3.**

*Obrázek nahoře je normotermní řez z levé komory v cirkulární vrstvě. Spodní obrázek je také z cirkulární vrstvy levé komory u hypotermního modelu. Na tomto příkladu je prokazatelně více proliferujících myocytů u hypotermního srdce. Měřítka je 50  $\mu\text{m}$ .*

Vztah lineární závislosti proliferace mezi oblastmi byl proveden korelačním koeficientem. Cílovými oblastmi byly cirkulární vrstvy levé komory proti papilárním svalům levé komory a cirkulární oblasti levé komory vůči stejné oblasti v pravé komoře. Ve všech případech byl pozitivní vztah. U normotermických dat je hodnota spolehlivosti  $R$  velká. U hypotermie je efekt mezi cirkulární vrstvou a papilárními svaly levé komory střední a v druhém případě je hodnota spolehlivosti malá. Tento výsledek ukazuje, že velký podíl na zbytnění srdce po hypotermické inkubaci má s velkou pravděpodobností hyperplazie.

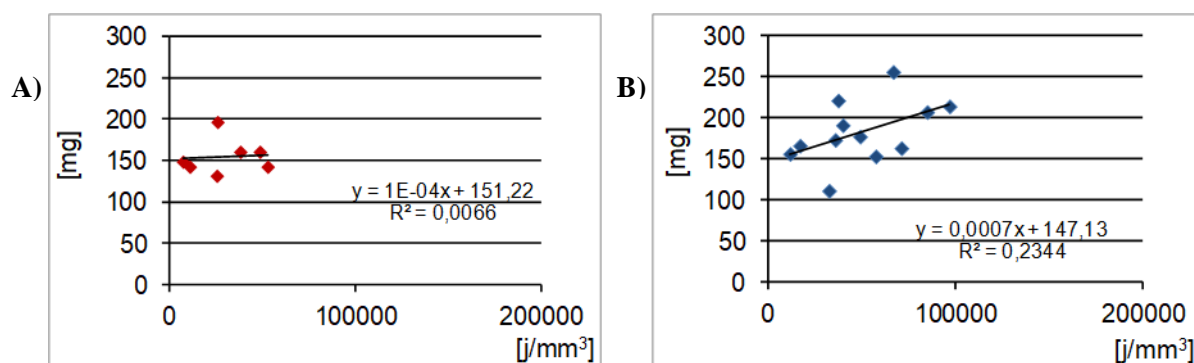


**Graf 11: Korelace proliferace mezi jednotlivými oblastmi v srdci.**

**A)** Cirkulární oblast levé komory proti papilárním svalům levé komory u normotermie. **B)** Cirkulární oblast levé komory proti papilárním svalům levé komory u hypotermie. **C)** Cirkulární vrstvy levé komory vůči cirkulární oblasti pravé komory u normotermie. **D)** Cirkulární vrstvy levé komory vůči cirkulární oblasti pravé komory u hypotermie.

Korelace mezi průměrným počtem proliferujících buněk v určitém objemu a váhy srdce měla v obou případech pozitivní charakter. Trend u normotermie není příliš výrazný, ale dle hodnoty spolehlivosti  $R$  je výsledek statisticky významný ( $P < 0,01$ ). U hypotermie se objevuje velmi pozitivní přímá závislost mezi hodnotami, která znamená, že větší srdce mají více proliferujících buněk než srdce menší. Při proložení jednotlivých oblastí vzhledem počtu proliferujících buněk na objem a hmotnost srdce vyšly téměř obdobné grafy (viz Příloha).

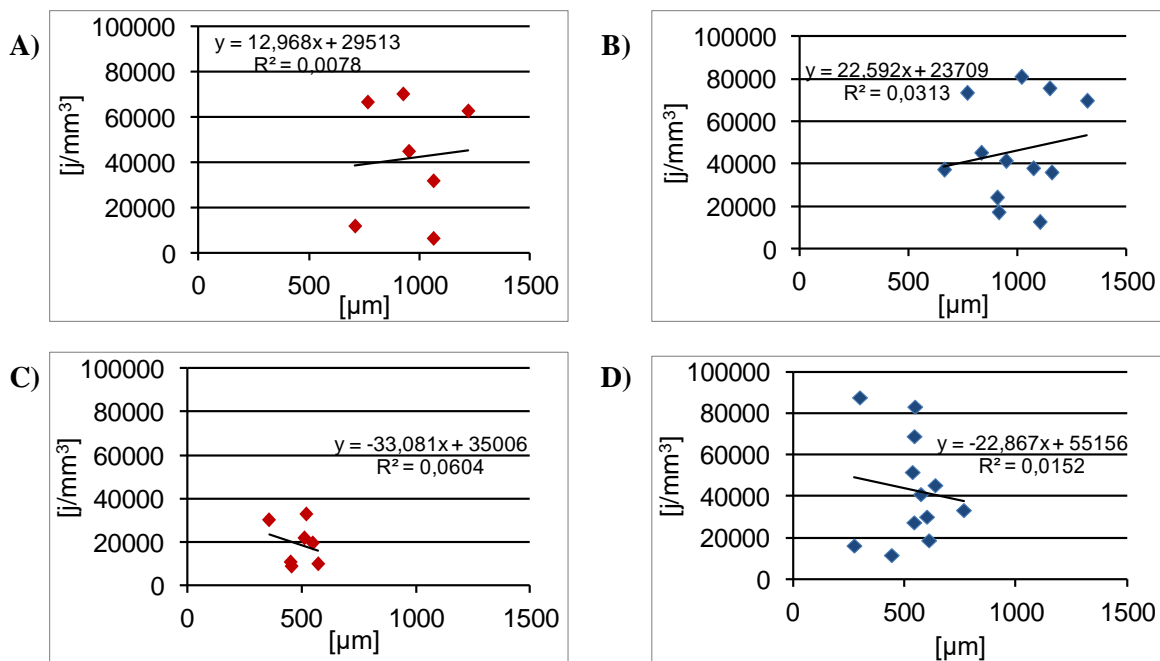




**Graf 12: Vztah mezi počtem proliferujících buněk v  $1\text{ mm}^3$  tkáně a váhou srdce.**

*Hodnoty spolehlivosti  $R$  jsou všude malé. A) Průměrné hodnoty cílových oblastí vůči hmotnosti srdce u normotermie. B) Průměrné hodnoty cílových oblastí proti váze srdce u hypotermie.*

Srovnání vztahu mezi proliferací a tloušťkou stěny vyšlo obdobně v rámci oblastí u obou testovaných skupin. Tloušťka stěny levé komory proti proliferaci levé komory v cirkulární zóně měla pozitivní trend u obou typů inkubace. Toto by znamenalo závislost, kdy v silnějších stěnách bude vyšší proliferace. Síla tohoto vztahu je však dle hodnoty spolehlivosti  $R^2$  malá. Na druhou stranu při korelaci proliferace pravé komory a šíře stěny komory vyšla negativní závislost v obou případech. To znamená, že v širší stěně nebude vyšší proliferace. Tato nasbíraná data mají hodnotu spolehlivosti  $R^2$  rovněž malou.



**Graf 13: Korelace mezi proliferací cirkulární vrstvy komory a tloušťkou stěny komory**

*Ve všech případech byla hodnota spolehlivosti  $R$  nevýznamná. A) Šíře levé komory proti proliferaci v levé komoře cirkulární zóna u normotermie. B) Tloušťka levé komory proti proliferaci cirkulární oblasti v levé komoře u hypotermie. C) Šíře pravé stěny proti proliferaci cirkulární oblasti pravé komory u normotermie. D) Tloušťka pravé komory proti proliferaci v pravé komoře cirkulární zóně u hypotermie.*

## 5 Diskuze

### 5.1 Hypotermický kuřecí model

Vzor pro tuto diplomovou práci vychází z publikace o hypotermií indukované hypertrofii u kuřecího modelu od autora Warbanow z roku 1970. Z tohoto důvodu nejprve vysvětlím metodický postup této práce. Dle doporučení autora byla vejce ( $n = 12$ ) držena od 11 ED do 17 ED v subnormálních podmínkách, což byla teplota  $33,5^{\circ}\text{C}$ . Souběžně s tímto probíhala inkubace i za standardních podmínek  $37^{\circ}\text{C}$  s kontrolní skupinou vajec ( $n = 7$ ). Autor zmiňuje nejvýraznější kardiomegalii právě při teplotě  $33,5^{\circ}\text{C}$ . Při vyšších teplotách nedocházelo k významnému poklesu velikosti a hmotnosti těla a současně ani ke znatelnému nárůstu srdce. Naopak u nižší teploty přežilo pouze 10-15% embryí a tato embrya měla velmi krátkou dobu přežití (1-2 dny). Embrya také byla morfologicky opožděna o jeden až čtyři dny od kontrol. Zvolenou teplotu  $33,5^{\circ}\text{C}$  autor hodnotí jako minimální pro životaschopnost embrya během hypotermní inkubace a po vytažení z vejce. Zároveň s tímto byla embrya na první pohled nerozeznatelná od normálně inkubovaných embryí, rozdíl se objevoval jen ve velikosti. Proto byla tato teplota zvolena jako vhodná pro náš experiment (Warbanow 1971, Warbanow 1970).

Naše výsledky ukazují předpoklady předchozího odstavce. Velikost těla byla u hypotermně inkubovaných embryí zmenšená a hmotnost srdce byla větší ve srovnání s embryi inkubovanými za normálních podmínek. V obou případech byla data statisticky významná a potvrzují je i výsledky z jiných studií hypotermní inkubace (Merkow and Leighton 1967, Merkow and Leighton 1966, Nakazawa et al. 1986, Lee et al. 2011). Důvod ke vzniku této kardiomegalie je způsoben nízkou okolní teplotou. Pokles okolní teploty sníží srdeční frekvenci, srdce vykazuje bradykardii. Snížená tepová frekvence nezvládá pokrýt požadavky organismu. Jako kompenzační mechanismus se zde objevuje zvětšení srdečního výdeje jedním úderem (*stroke volume*) (Benson Jr et al. 1989). Nárůst objemu srdeční tkáně vlivem větší srdeční práce je způsoben zvětšením délky a šířky buněk do určité hmotnosti srdce (Linzbach 1960, Oparil et al. 1984). Využívá Frank – Starlingova mechanismu, kde je energie potřebná ke kontrakci přímo úměrná délce srdečních vláken. Při protažení srdečních vláken dochází ke zvětšení síly stahu. Po dlouhotrvajícím potřebě silnějšího stahu dochází ke zbytnění stěny komor. Zvýšené zatížení srdce je spojeno s růstem srdeční váhy (Oparil et al. 1984). U hypotermicky inkubovaných embryí byla pozorována lepší schopnost kontraktility, hodnoty byly většinou až dvojnásobné (Warbanow 1971).

V publikaci Warbanow (1970) vysvětluje, že kardiomegalie je zapříčiněná hypertrofií. Autor vychází ze snímků ze světelného mikroskopu po značení hematoxylin a eosin. V publikaci dokazuje, že je znatelný rozdíl ve velikosti u hypotermních buněk. Jako příklad jsou uvedeny dva



příkladné snímky, ovšem na malém zvětšení (viz náš Obrázek 10). Dle našeho měření po značení hemaxylinem a eosinem vyšly hodnoty velmi podobně a to ve všech cílových oblastech. Data se však nepodařilo nasbírat ze všech oblastí ani po opakování značení. Celkové měření jednotlivých buněk bylo velmi orientační, protože nebyla snadno určitelná membrána buněk. Z tohoto důvodu jsme zhodnotili tento způsob jako nevhodný pro kvantitativní určení příčného průměru buněk a použili jsme jiný způsob značení.

Druhý způsob imunohistochemickým značením vyvrací teorii Warbanowa o hypertrofii indukované hypotermií jako výhradním mechanismu pro zvětšení tkáně srdce. Výsledky po tomto značení vyšly opět velmi podobně mezi oběma způsoby inkubace a zároveň ve všech vybraných oblastech pracovního myokardu. To znamená, že po hypotermii nedochází ke kardiomegalii způsobené pouze hypertrofií. Předpokladem pro měření příčného průměru buněk byl harmonizovaný růst obou parametrů. Pokud se vlákna zvětšují, poměr mezi délkou a šířkou je stále stejný (Linzbach 1960). Nicméně jiní autoři ve svých publikacích zmiňují, že při změnách podmínek buňka rovnoměrně neroste. Dochází k výraznějšímu růstu v délce proti šířce po objemovém zatížení či dilataci komor (Astorri et al. 1977, Oparil et al. 1984, Gerdes et al. 1983). Měření délky kardiomyocytů v této práci nebylo provedeno z důvodu komplikovaného protokolu. Tvar kardiomyocytů je vřetenovitý, proto je obtížné zachytit na řezu buňku celou. Druhou možností je izolace jednotlivých kardiomyocytů a následné měření. Tento protokol je však poměrně časově komplikovaný a počet získaných myocytů je nízký.

## **5.2 Korelace mezi velikostí buněk, hmotností srdce a těla**

Poměr hmotnosti srdce a těla (váha srdce/váha těla x 100) se velmi liší mezidruhově. V našem případě byl výsledek u hypotermní skupiny o téměř 70% vyšší než u kontrolní skupiny. Po přesunu z vody na souš došlo v některých případech až ke ztrojnásobení velikosti srdce obratlovců (Poupa 1993). Relativně největší hmotnost srdce se objevuje právě u ptáků, poté jsou savci a nakonec poikilotermové (Ostadal 2013). Srdeční nárůst je způsoben většími energetickými požadavky na udržení stálé teploty a zároveň náročný antigravitační let ptáků (Poupa and Ostadal 1969, Else and Hulbert 1983). Velikost srdce je rovněž výrazně ovlivněna životním stylem daného druhu, například u ryb se objevují mnohem větší srdce u druhů s vyšší pohybovou aktivitou. Podobné pozorování bylo i u jiných skupin obratlovců, jako jsou plazi a hlavně obojživelníci. V některých případech se objevují výjimky, ve kterých i méně aktivní druhy mají vzhledem k hmotnosti těla velká srdce (Ostadal 2013). Například nejvyšší hodnota poměru v hmotnostech srdce a těla nastává čtvrtý až pátý den u potkana, poté hodnota klesá (Clubb and Bishop 1984).

Závislost mezi velikostí buněk a hmotností srdce je možná překvapivě ve většině případů kladná. Tato pozitivní korelace značí, že ve větším srdci se budou objevovat větší buňky. Nicméně

u normotermie byly hodnoty velmi podobné a tvořily jednotnou skupinu. Obecně převládala malá hodnota spolehlivosti. Jen v jednom případě byla hodnota spolehlivosti poměrně velká, což bylo pravděpodobně dáno přítomností jedné odlehle hodnoty. U hypotermie byly hodnoty mnohem variabilnější než u kontrol, což je dáno větším počtem embryí a zároveň větším rozptylem prakticky všech parametrů. Opět převládala pozitivní korelace mezi velikostí srdce a buněk, pouze v pravé komoře byla negativní závislost. To je pravděpodobně způsobeno velkou variabilitou naměřených hodnot či odlehlými hodnotami. Tento výsledek nevylučuje hypertrofii jako možný podíl na růstu srdeční tkáně.

### 5.3 Regionální rozdíly v srdečních oddílech

Srovnávali jsme cirkulární oblast a papilární svaly levé komory a cirkulární vrstvu levé a pravé komory. Korelační koeficienty mezi cílovými oblastmi u normotermicky inkubovaných tvořily poměrně jednotnou skupinu. V případě porovnání oblastí z levé komory mezi hodnotami nebyla závislost a v druhém případě srovnání levé a pravé komory byla mezi hodnotami závislost. U obou korelačních koeficientů byla hodnota spolehlivosti malá. Nepřítomnost příliš odlehlých hodnot může být způsobena nízkým počtem normotermicky inkubovaných embryí. U hypotermie nám vyšla závislost mezi oblastmi v obou případech pozitivně a hodnota spolehlivosti byla střední až velká. Tyto pozitivní koeficienty značí, že jde o vyrovnanou velikost buněk v rámci oblasti. Pokud jsou kardiomyocyty v jedné oblasti velké, budou velké i v oblasti jiné. Záporná korelace u normotermie může být způsobena relativně malým počtem kontrol. V jedné studii je však navrženo, že vlákna levé komory jsou oproti pravé tlustější u dospělého jedince (Linzbach 1960). Což odpovídá vyšší zátěži v postnatálním životě u levé komory. V prenatální fázi jsou velikosti více vyrovnané, protože na buňky obou komor je kladen vyrovnaný tlak. Například u embrya potkana se liší rychlost růstu a diferenciací v jednotlivých srdečních segmentech. Vyšší růst v určité oblasti srdce je zajištěn hyperplazií kardiomyocytů (Knaapen et al. 1996).

Šíře stěny levé komory byla průměrně dvojnásobně větší než u pravé komory. Hodnoty jsou při normotermii i hypotermii signifikantní. Nejednota mezi levou a pravou komorou může být dána menším počtem vrstev v pravé komoře (Linzbach 1960). Množství kardiomyocytů je nižší v pravé komoře a jejich celková hustota je nižší. Nevyrovnanost mezi komorami je způsobena remodelací brzy po narození (Smolich et al. 1989, Kajstura et al. 1995, Burrell et al. 2003). Buňky v pravé komoře mají schopnost se dělit déle než v levé komoře. Je to pravděpodobně způsobené větší hemodynamickou zátěží v levé komoře. Po narození jsou na ní kladeny mnohem větší nároky, což urychlí maturaci levé komory (Stacy et al. 2009). Ještě při narození je však počet kardiomyocytů v obou komorách podobný (Anversa et al. 1980). Apoptóza je nevýraznější první postnatální den a poté klesá (Fernandez et al. 2001) a je mnohem znatelnější v pravé komoře (Porrello et al. 2008).

Finální počet kardiomyocytů je určen primárně velikostí srdce, která se vztahuje k fetálnímu a brzo postnatálnímu růstu. Je přímo závislý na tělní váze a hmotnosti srdce (Stacy et al. 2009). Dle našich výsledků závislost mezi velikostí buněk a šířkou stěny komory nebyla potvrzena, u obou způsobů inkubace byla jeden výsledek negativní a druhý pozitivní. Navíc byla data málo významná dle hodnoty spolehlivosti

Prokazatelně větší levá komora a její stěna se u ptáků objevuje běžně. Tento fakt je u nich dán velkými nároky na dodávku krve pro létací svaly (King and McLelland 1984). Větší komorová dutina bude mít nároky na silnější stěnu komory, aby bylo možné velký objem z dutiny vytlačit silou stahu. Dospělá ptačí kompaktní vrstva v levé komoře je dokonce pětikrát širší než pravá. U savců je tento poměr 3:1 pro levou komoru (Sedmera et al. 1997). Při měření plochy nebyl objeven výrazný rozdíl mezi levou a pravou komorou za standardních podmínek ve stádiu HH 27 (Tobita and Keller 2000). Tento fakt může být způsoben silnější vrstvou trabekul pravé komory, které je pro ni postnatálně typické. Naše měření bylo zacíleno pouze na kompaktní vrstvu bez trabekul, jejichž podíl na celkové hmotě myokardu byl na námi analyzovaném stádiu již minoritní (Sedmera et al., 1997).

## **5.4 Reakce embryonálního srdce na změny hemodynamiky**

Při experimentálním podvazu výtokové části srdce se hodnoty změřené plochy průřezu lišily dle způsobu zátěže (Tobita and Keller 2000). To odpovídá předpokladu, že stěna komor se přizpůsobuje změnám hemodynamických podmínek pro potřeby organismu. V časném embryonálním období je přizpůsobení stěny výraznější v trabekulách, které jsou klíčové pro kontraktilní funkci v tomto období (Tobita and Keller 2000, Sedmera et al. 1997, Clark et al. 1984). Embryonální architektura myokardu je zcela odlišná od dospělé kuřecí komory i v kompaktní vrstvě (Tobita and Keller 2000). Obecně je mnohem tenčí u embryí než v pozdním fetálním období nebo u dospělců. Většinu stěny zajišťují trabekuly právě v počátečním embryonálním období před zapojením koronární cirkulace (Ben-Schachar et al. 1985, Sedmera et al. 1997).

Proliferace myocytů je v našich výsledcích téměř dvojnásobně zvýšena po hypotermní inkubaci. Statisticky významné je toto zvětšení proliferace pouze v pravé komoře. Vztah proliferačního potenciálu mezi oblastmi vyšel pozitivně ve všech případech a u normotermie byla hodnota spolehlivosti velká. Překvapivě k našim výsledkům vyšly hodnoty v publikaci Warbanow (1970) nesouhlasně. To vysvětluje jeho dedukci o růstu zajištěném pouze hypertrofií po hypotermní inkubaci. Uvádí, že množství jader bylo u kardiomegalie nižší než u normotermie. Zároveň byla redukována hodnota hydroxyprolinu na mg sušiny srdeční tkáně. O rok později však autor píše o kontraktilních vlastnostech hypotermicky inkubovaného srdce. Zmiňuje zde, že kardiomegalie

byla zajištěna kombinací růstu hypertrofií a hyperplazií (Warbanow 1971). Korelace mezi proliferací a hmotností srdce nám vyšla kladně, ale hodnota spolehlivosti byla malá.

Hyperplazie může být kompenzační mechanismus dlouhodobého srdečního zvětšení. Je zde hypotéza, že při pomalém tlakovém přetížení v pravé komoře dojde k hyperplastickému růstu myocytů o 41% a zvětšení průměrného objemu na jádro bylo o 28%. Hyperplazie a hypertrofie se tak mohou podílet na zbytnění myokardu paralelně. Například u lidského srdce je navržena kritická hmotnost 500g, nad kterou bude další růst zajištěn hlavně hyperplasticky (Linzbach 1960, Olivetti et al. 1987). Obdobné výsledky byly dokumentovány i jiné studii, kde je určena kritická hodnota 100g pravé komory pro lidské srdce. Pod touto hmotností je růst hypertrofický a nad touto hodnotou je zajištěn kombinací hyperplazie a později hypertrofie (Astorri et al. 1971). U levé komory byla stanovena kritická hmotnost 250 g u lidského srdce. Při této kritické hmotnosti byl progresivní růst velikosti buněk, ale byl nižší než růst stěny (Astorri et al. 1977).

Ve většině výrazných prenatálních patologických podmínek je kompenzační růst zajištěn hyperplazií (Sedmera and Thompson 2011, Sedmera et al. 2003b). DNA syntéza byla objevena v hypertrofované levé komoře (Morkin and Ashford 1968, Meerson et al. 1968, Nair et al. 1968). Tento jev byl také pozorován v experimentech s podvazem aorty u potkanů (Wegner and Mölbert 1966) či infarktem zasažené srdeční tkáně (Shafiq et al. 1968). Po experimentální stenóze aorty se nejprve objevuje hyperplazie a teprve poté hypertrofie (Wegner and Mölbert 1966). Tyto výsledky z různých studií nám ukazují, že přizpůsobení srdeční tkáně hemodynamické zátěži u dospělců obvykle nastává hypertrofickým růstem nebo kombinací hyperplazie a hypertrofie.

Buněčné dělení se uplatňuje hlavně během embryonálního období, krátce po narození či vylíhnutí srdeční sval ztrácí svou schopnost dělit se (Shafiq et al. 1968, Manasek 1968). V dalších fázích je postnatální růst zajištěn hlavně hypertrofií (Li et al. 1997, Oparil et al. 1984). Přepnutí z hyperplazie na hypertrofii je druhově specifické (Wills et al. 2008). Spouštěč tohoto přepnutí je nicméně stále neznámý (Jung et al. 2011). Po přepnutí dochází k zvětšení objemu buněk u některých druhů 30-40x (Oparil et al. 1984). Obvykle bývá pravidlem, že kontraktilní, jednojaderné a nediferenciované buňky se mohou dále dělit (Manasek 1968). Obecně množství dělení buněk klesá s přibývajícím věkem již od narození (Overy and Priest 1966, Enesco and LeBlond 1962). Překvapující je poté fakt, že počet jader je v dospělém srdci dvakrát větší než při narození. Předpokládá se, že to způsobeno rozdělení jádra kardiomyocytu bez následné cytokineze (Grove et al. 1969).

Pro podpoření této hypotézy většina buněk je v dospělosti dvoujaderných (Petersen and Baserga 1965, Katzberg et al. 1977). Tato dvoujadernost je limitujícím faktorem pro další dělení buněk. V tomto stádiu dvoujadernosti jsou buňky již plně diferenciované (Jung et al. 2011, Oparil et al. 1984). U člověka se objevuje dvoujadernost mnohem vzácněji než u ostatních zvířat, naopak má

mnohem více polyploidních myocytů. Počet diferencovaných a s tím vícejadernost buněk přibývá během života každého jedince (Sandritter and Scomazzoni 1964). Dle studie dělané u lidí bylo však prokázáno, že polovina myocytů je nahrazena během života (Bergmann et al. 2009). Podle další studie je počet myocytů při narození menší než v dospělosti, hyperplazie probíhá i v postnatálním období (Korecky and Rakusan 1978). S velkou pravděpodobností se hyperplazie v srdečním svalu nezastaví definitivně brzy po narození, velmi také záleží, o jaký typ buňky půjde. Intenzita proliferace po narození se již dále nezvyšuje.

## **5.5 Změny v převodním systému**

Purkyňova vlákna jsou po hypotermní inkubaci lehce větší než kontroly. Větší velikost však není signifikantní. Drobné zvětšení po hypotermii může naznačovat hypertrofický způsob růstu. Zde nebyla provedena kontrola proliferačního růstu, protože získání dostatečného počtu pozitivních jader by bylo vzhledem k celkovému objemu Purkyňových buněk mizivé. Určení a následná analýza Purkyňových vláken obvykle bývá dle jejich lokalizace v myokardu, což je podél subendokardu nebo v blízkosti arterií (Davies 1930, Gourdie et al. 1995). Tento způsob jejich detekce jsme tedy použili i v této studii. Další možností určení je značení pomocí protilátky proti Cx40, hlavního konexinu v převodním systému (Miquerol et al. 2004), jak bylo ukázáno na myším modelu. U kuřecího modelu jsme tento protokol však ještě nezkooušeli.

Zároveň jsou Purkyňova vlákna menší než pracovní kardiomyocyty, u normotermní skupiny je výsledek statisticky významný. V jiných studiích se srovnáním velikosti Purkyňových vláken se tato velikost velmi lišila u jednotlivých druhů. U potkanů, myší a makaků je jejich velikost menší než u pracovních myocytů. Zato u jiných druhů, jako jsou například šelmy, lidé, kopytníci, jsou tyto vlákna převodního systému větší (Ono et al. 2009). Srovnání velikostí u kuřecího modelu a současně v embryonálním období nebylo v aktuální literatuře nalezeno. Menší velikost může být zapříčiněna opožděným růstem oproti kardiomyocytům, protože Purkyňová vlákna jsou v tomto období strukturně méně diferencována. Nicméně tento fakt nebyl nikde srovnáván.

## 6 Závěr

Naše výsledky částečně potvrdily předpoklad ze 70. let minulého století. Vlivem nižší inkubační teploty dochází k signifikantnímu zmenšení velikosti těla a zvětšení srdce u experimentální skupiny kuřecích embryí. Zvětšení srdeční tkáně nemohlo být ale zajištěno pouze hypertrofickým růstem buněk. Příčné průměry buněk nám vyšly v cílových oblastech velmi podobně u hypotermní i kontrolní skupiny po imunohistochemickém značení i po značení hematoxylin a eosin. Hypotermní buňky vykazovaly mnohem větší variabilitu ve velikosti. Nicméně korelační analýza ve většině případů nasvědčovala vyrovnaný růst mezi vybranými oblastmi či srovnání velikosti buněk k hmotnosti srdce. Levá kompaktní vrstva komory byla oproti pravé komoře dvojnásobná. Tento rozdíl se během dospělosti ještě mnohem zvětší pro potřeby organismu. Lehký nárůst v šíři stěny, který odpovídá zbytnění srdce, se objevil u hypotermní skupiny. Purkyňova vlákna, terminální část převodního systému srdečního, byla lehce menší než běžné pracovní kardiomyocyty. Tato vlákna se obvykle velmi liší mezi druhy a v literatuře se jejich popis dost rozchází. U hypotermie byla Purkyňova vlákna nesignifikantně zvětšena. Rozdíl nebyl nijak výrazný a nelze říct, že šlo o hypertrofický růst těchto vláken. Proliferační index byl určen po imunohistochemické značení pHIS 3 a následně vyjádřeno množstvím pozitivních jader na objem. Hodnoty proliferace byly u hypotermického modelu až dvojnásobné s výjimkou levé komory v cirkulární zóně. U pravé komory byl výsledek statisticky významný. Korelace mezi jednotlivými oblastmi potvrzovala vyrovnanou proliferaci v celém srdci a to výrazněji u hypotermního modelu. Dle našich výsledků lze na závěr říct, že po hypotermní inkubaci dochází ke kardiomegalii způsobené hyperplazií a s drobným podílem buněčné hypertrofie.

## 7 Přehled literatury

- ACCILI E, PROENZA C, BARUSCOTTI M AND DIFRANCESCO D. 2002. From funny current to HCN channels: 20 years of excitation. *Physiology* 17: 32-37.
- ADAMS F 1849. The genuine works of Hippocrates. n. 17: Sydenham society.
- AKAZAWA H AND KOMURO I. 2003. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circulation research* 92: 1079-1088.
- ANDERSON R, BECKER A, TRANUM-JENSEN J AND JANSE M. 1981. Anatomico-electrophysiological correlations in the conduction system--a review. *British Heart Journal* 45: 67.
- ANSARI A, YEN HO S AND ANDERSON RH. 1999. Distribution of the Purkinje fibres in the sheep heart. *The Anatomical Record* 254: 92-97.
- ANVERSA P, OLIVETTI G AND LOUD AV. 1980. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. *Circ Res* 46: 495-502.
- ASTORRI E, BOLOGNESI R, COLLA B, CHIZZOLA A AND VISIOLI O. 1977. Left ventricular hypertrophy: a cytometric study on 42 human hearts. *Journal of molecular and cellular cardiology* 9: 763-775.
- ASTORRI E, CHIZZOLA A, VISIOLI O, ANVERSA P, OLIVETTI G AND VITALI-MAZZA L. 1971. Right ventricular hypertrophy—a cytometric study on 55 human hearts. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2: 99-110.
- ATKINSON A, INADA S, LI J, TELLEZ JO, YANNI J, SLEIMAN R, ALLAH EA, ANDERSON RH, ZHANG H AND BOYETT MR. 2011. Anatomical and molecular mapping of the left and right ventricular His–Purkinje conduction networks. *Journal of molecular and cellular cardiology* 51: 689-701.
- BAKKER ML, MOORMAN AF AND CHRISTOFFELS VM. 2010. The atrioventricular node: origin, development, and genetic program. *Trends in cardiovascular medicine* 20: 164-171.
- BEINLICH CJ, RISSINGER CJ AND MORGAN HE. 1995. Mechanisms of rapid growth in the neonatal pig heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 27: 273-281.
- BELTRAMI AP, URBANEK K, KAJSTURA J, YAN S-M, FINATO N, BUSSANI R, NADAL-GINARD B, SILVESTRI F, LERI A AND BELTRAMI CA. 2001. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *New England Journal of Medicine* 344: 1750-1757.
- BEN-SCHACHAR G, LUCAS R, ARCILLA R AND MANASEK F. 1985. Muscular interventricular septum formation in the chick embryo. *Circ Res* 57: 759-766.
- BENES J, AMMIRABILE G, SANKOVA B, CAMPIONE M, KREJCI E, KVASILOVA A AND SEDMERA D. 2014. The role of connexin40 in developing atrial conduction. *FEBS letters* 588: 1465-1469.
- BENSON JR DW, HUGHES SF, HU N AND CLARK EB. 1989. Effect of heart rate increase on dorsal aortic flow before and after volume loading in the stage 24 chick embryo. *Pediatric research* 26: 438.
- BERGMANN O, BHARDWAJ RD, BERNARD S, ZDUNEK S, BARNABÉ-HEIDER F, WALSH S, ZUPICICH J, ALKASS K, BUCHHOLZ BA AND DRUID H. 2009. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324: 98-102.
- BEYER EC. 1990. Molecular cloning and developmental expression of two chick embryo gap junction proteins. *Journal of Biological Chemistry* 265: 14439-14443.

- BEYER EC, KISTLER J, PAUL DL AND GOODENOUGH DA. 1989. Antisera directed against connexin43 peptides react with a 43-kD protein localized to gap junctions in myocardium and other tissues. *The Journal of cell biology* 108: 595-605.
- BIGELOW W, LINDSAY W AND GREENWOOD W. 1950. Hypothermia: its possible role in cardiac surgery: an investigation of factors governing survival in dogs at low body temperatures. *Annals of surgery* 132: 849.
- BLACK PR, VAN DEVANTER S AND COHN LH. 1976. Effects of hypothermia on systemic and organ system metabolism and function. *Journal of Surgical Research* 20: 49-63.
- BONOW RO, MANN DL, ZIPES DP AND LIBBY P. 2012. Braunwald's heart disease. A textbook of cardiovascular medicine 9: 1042-1048.
- BOSE A, TRUONG QA AND SINGH JP. 2015. Biomarkers in electrophysiology: role in arrhythmias and resynchronization therapy. *Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology* 43: 31-44.
- BRADY T, GESSERT S, KÜHL M AND PANDUR P. 2007. The amphibian second heart field: *Xenopus* islet-1 is required for cardiovascular development. *Developmental biology* 311: 297-310.
- BREASTED JH 1930. The Edwin Smith Surgical Papyrus: published in facsimile and hieroglyphic transliteration with translation and commentary in two volumes. n. 3: Chic. UP.
- BRESSAN M, LIU G AND MIKAWA T. 2013. Early mesodermal cues assign avian cardiac pacemaker fate potential in a tertiary heart field. *Science*: 1232877.
- BRITT LD, DASCOMBE WH AND RODRIGUEZ A. 1991. New horizons in management of hypothermia and frostbite injury. *Surgical Clinics of North America* 71: 345-370.
- BRUNEAU BG, NEMER G, SCHMITT JP, CHARRON F, ROBITAILLE L, CARON S, CONNER DA, GESSLER M, NEMER M AND SEIDMAN CE. 2001. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor *Tbx5* in cardiogenesis and disease. *Cell* 106: 709-721.
- BUCKINGHAM M, MEILHAC S AND ZAFFRAN S. 2005. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nature Reviews Genetics* 6: 826.
- BUKAUSKAS FF, BUKAUSKIENE A, BENNETT MV AND VERSELIS VK. 2001. Gating properties of gap junction channels assembled from connexin43 and connexin43 fused with green fluorescent protein. *Biophysical journal* 81: 137-152.
- BUKAUSKAS FF AND VERSELIS VK. 2004. Gap junction channel gating. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1662: 42-60.
- BURRELL JH, BOYN AM, KUMARASAMY V, HSIEH A, HEAD SI AND LUMBERS ER. 2003. Growth and maturation of cardiac myocytes in fetal sheep in the second half of gestation. *The Anatomical Record* 274: 952-961.
- CANALE ED, CAMPBELL GR AND SMOLICH JJ 2012. Cardiac muscle. n. 2: Springer Science & Business Media.
- CLARK A. 1920. The effect of alterations of temperature upon the functions of the isolated heart. *The Journal of physiology* 54: 275-286.
- CLARK EB AND HU N. 1982. Developmental hemodynamic changes in the chick embryo from stage 18 to 27. *Circulation Research* 51: 810-815.
- CLARK EB, HU N AND ROSENQUIST GC. 1984. Effect of conotruncal constriction on aortic-mitral valve continuity in the stage 18, 21 and 24 chick embryo. *The American journal of cardiology* 53: 324-327.



- CLUBB JF AND BISHOP S. 1984. Formation of binucleated myocardial cells in the neonatal rat. An index for growth hypertrophy. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 50: 571-577.
- ČIHÁK R 1997. Anatomie 3. Grada Publishing.
- DAVEE TS AND REINEBERG EJ. 1980. Extreme hypothermia and ventricular fibrillation. Annals of emergency medicine 9: 100-102.
- DAVIES F. 1930. The conducting system of the bird's heart. Journal of anatomy 64: 129.
- DAVIES F. 1942. The conducting system of the vertebrate heart. British Heart Journal 4: 66.
- DAVIS LM, RODEFELD ME, GREEN K, BEYER EC AND SAFFITZ JE. 1995. Gap junction protein phenotypes of the human heart and conduction system. Journal of cardiovascular electrophysiology 6: 813-822.
- DAWSON N, DICKENSON A, HELLON R AND WOOLF C. 1981. Inhibitory controls on thermal neurones in the spinal trigeminal nucleus of cats and rats. Brain research 209: 440-445.
- DE JONG F, OPTHOF T, WILDE A, JANSE M, CHARLES R, LAMERS W AND MOORMAN A. 1992. Persisting zones of slow impulse conduction in developing chicken hearts. Circulation Research 71: 240-250.
- DEHAAN RL. 1965. Development of pacemaker tissue in the embryonic heart. Annals of the New York Academy of Sciences 127: 7-18.
- DELORME B, DAHL E, JARRY-GUICHARD T, BRIAND J-P, WILLECKE K, GROS D AND THÉVENIAU-RUISSY M. 1997. Expression pattern of connexin gene products at the early developmental stages of the mouse cardiovascular system. Circulation research 81: 423-437.
- DIFRANCESCO D. 1993. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. Annual review of physiology 55: 455-472.
- DIFRANCESCO D. 2010. The role of the funny current in pacemaker activity. Circulation research 106: 434-446.
- EICHNA LW AND DEHAAN RL. 1961. Differentiation of the atrioventricular conducting system of the heart. Circulation 24: 458-470.
- ELSE P AND HULBERT A. 1983. A comparative study of the metabolic capacity of hearts from reptiles and mammals. Comparative biochemistry and physiology A, Comparative physiology 76: 553-557.
- ENESCO M AND LEBLOND CP. 1962. Increase in cell number as a factor in the growth of the organs and tissues of the young male rat. Development 10: 530-562.
- FERNANDEZ E, SIDDIQUEE Z AND SHOHET RV. 2001. Apoptosis and proliferation in the neonatal murine heart. Developmental Dynamics 221: 302-310.
- GANONG WF 2005. Přehled lékařské fyziologie. Galén.
- GARCIA-MARTINEZ V AND SCHOENWOLF GC. 1993. Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. Developmental biology 159: 706-719.
- GARCIA-BUSTOS V, SEBASTIAN R, IZQUIERDO M, MOLINA P, CHORRO F AND RUIZ-SAURI A. 2017. A quantitative structural and morphometric analysis of the Purkinje network and the Purkinje-myocardial junctions in pig hearts. Journal of anatomy 230: 664-678.
- GENIS C, SCONE P, KASAHARA H AND NAM H-J. 2008. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the NKX2. 5 homeodomain in complex with DNA. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications 64: 1079-1082.

- GERDES A, KRISEMAN J AND BISHOP S. 1983. Changes in myocardial cell size and number during the development and reversal of hyperthyroidism in neonatal rats. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 48: 598-602.
- GIEPMANS BN. 2004. Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovascular research* 62: 233-245.
- GOLDBERG GS, LAMPE PD AND NICHOLSON BJ. 1999. Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nature Cell Biology* 1: 457.
- GORZA L, SCHIAFFINO S AND VITADELLO M. 1988. Heart conduction system: a neural crest derivative? *Brain research* 457: 360-366.
- GOURDIE RG. 1995. A map of the heart: gap junctions, connexin diversity and retroviral studies of conduction myocyte lineage. *Clinical Science* 88: 257-262.
- GOURDIE RG, GREEN CR, SEVERS NJ, ANDERSON RH AND THOMPSON RP. 1993a. Evidence for a distinct gap-junctional phenotype in ventricular conduction tissues of the developing and mature avian heart. *Circulation research* 72: 278-289.
- GOURDIE RG, MIMA T, THOMPSON RP AND MIKAWA T. 1995. Terminal diversification of the myocyte lineage generates Purkinje fibers of the cardiac conduction system. *Development* 121: 1423-1431.
- GOURDIE RG, SEVERS NJ, GREEN CR, ROTHERY S, GERMROTH P AND THOMPSON RP. 1993b. The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system. *Journal of cell science* 105: 985-991.
- GOURDIE RG, WEI Y, KIM D, KLATT SC AND MIKAWA T. 1998. Endothelin-induced conversion of embryonic heart muscle cells into impulse-conducting Purkinje fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 6815-6818.
- GROVE D, ZAK R, NAIR K AND ASCHENBRENNER V. 1969. Biochemical correlates of cardiac hypertrophy: IV. Observations on the cellular organization of growth during myocardial hypertrophy in the rat. *Circulation Research* 25: 473-485.
- HADDIX TL, POHLMAN TH, NOEL RF, SATO TT, BOYLE JR EM AND VERRIER ED. 1996. Hypothermia inhibits human E-selectin transcription. *Journal of Surgical Research* 64: 176-183.
- HALL CE, HURTADO R, HEWETT KW, SHULIMOVICH M, POMA CP, RECKOVA M, JUSTUS C, PENNISI DJ, TOBITA K AND SEDMERA D. 2004. Hemodynamic-dependent patterning of endothelin converting enzyme 1 expression and differentiation of impulse-conducting Purkinje fibers in the embryonic heart. *Development* 131: 581-592.
- HAMBURGER V AND HAMILTON HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of morphology* 88: 49-92.
- HAYWARD M AND KEATINGE W. 1979. Progressive symptomless hypothermia in water: possible cause of diving accidents. *British Medical Journal* 1: 1182.
- HEMINGWAY A. 1963. Shivering. *Physiological reviews* 43: 397-422.
- HERVEY G 1973. *Hypothermia: Physiological Changes Encountered in Hypothermia*. SAGE Publications.
- HILDEBRAND F, GIANNOUDIS PV, VAN GRIENSVEN M, CHAWDA M AND PAPE H-C. 2004. Pathophysiologic changes and effects of hypothermia on outcome in elective surgery and trauma patients. *The American journal of surgery* 187: 363-371.
- CHALLICE CE AND VIRAGH S 1973. *The embryologic development of the mammalian heart. Ultrastructure of the mammalian heart*: Elsevier, p. 91-126.

- CHENG G, LITCHENBERG WH, COLE GJ, MIKAWA T, THOMPSON RP AND GOURDIE RG. 1999. Development of the cardiac conduction system involves recruitment within a multipotent cardiomyogenic lineage. *Development* 126: 5041-5049.
- CHRISTOFFELS VM, SMITS GJ, KISPert A AND MOORMAN AF. 2010. Development of the pacemaker tissues of the heart. *Circulation research* 106: 240-254.
- JALIFE J, MORLEY GE AND VAIDYA D. 1999. Connexins and impulse propagation in the mouse heart. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 10: 1649-1663.
- JAMES TN. 1967. Anatomy of the cardiac conduction system in the rabbit. *Circulation research* 20: 638-648.
- JANSE MJ AND WIT AL. 1989. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiological reviews* 69: 1049-1169.
- JANSEN JA, VAN VEEN TA, DE BAKKER JM AND VAN RIJEN HV. 2010. Cardiac connexins and impulse propagation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 48: 76-82.
- JAY PY, HARRIS BS, MAGUIRE CT, BUERGER A, WAKIMOTO H, TANAKA M, KUPERSHMIT S, RODEN DM, SCHULTHEISS TM AND O'BRIEN TX. 2004. Nkx2-5 mutation causes anatomic hypoplasia of the cardiac conduction system. *The Journal of clinical investigation* 113: 1130-1137.
- JENSEN B, WANG T, CHRISTOFFELS VM AND MOORMAN AF. 2013. Evolution and development of the building plan of the vertebrate heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1833: 783-794.
- JUNG S, SILVIUS D, NOLAN KA, BORCHERT GL, MILLET YH, PHANG JM AND GUNN TM. 2011. Developmental cardiac hypertrophy in a mouse model of prolidase deficiency. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 91: 204-217.
- KAJSTURA J, ZHANG X, LIU Y, SZOKE E, CHENG W, OLIVETTI G, HINTZE TH AND ANVERSA P. 1995. The cellular basis of pacing-induced dilated cardiomyopathy: myocyte cell loss and myocyte cellular reactive hypertrophy. *Circulation* 92: 2306-2317.
- KANNO S AND SAFFITZ JE. 2001. The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovascular pathology* 10: 169-177.
- KATZBERG AA, FARMER BB AND HARRIS RA. 1977. The predominance of binucleation in isolated rat heart myocytes. *Developmental Dynamics* 149: 489-499.
- KEATINGE W AND EVANS M. 1961. The respiratory and cardiovascular response to immersion in cold and warm water. *Experimental Physiology* 46: 83-94.
- KELLY RG, BUCKINGHAM ME AND MOORMAN AF. 2014. Heart fields and cardiac morphogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4: a015750.
- KING AS AND MCLELLAND J 1984. *Birds, their structure and function*. Bailliere Tindall, 1 St. Annes Road.
- KIRBY ML 2007. *Cardiac development*. Oxford University Press.
- KNAAPEN M, VROLIJK B AND WENINK A. 1996. Nuclear and cellular size of myocytes in different segments of the developing rat heart. *The Anatomical Record* 244: 118-125.
- KOIBUCHI N AND CHIN MT. 2007. CHF1/Hey2 plays a pivotal role in left ventricular maturation through suppression of ectopic atrial gene expression. *Circulation research* 100: 850-855.
- KOMURO I AND IZUMO S. 1993. Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 8145-8149.

- KORECKY B AND RAKUSAN K. 1978. Normal and hypertrophic growth of the rat heart: changes in cell dimensions and number. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 234: H123-H128.
- KREUZBERG MM, SCHRICKEL JW, GHANEM A, KIM J-S, DEGEN J, JANSSEN-BIENHOLD U, LEWALTER T, TIEMANN K AND WILLECKE K. 2006. Connexin30. 2 containing gap junction channels decelerate impulse propagation through the atrioventricular node. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 5959-5964.
- LANIER WL, IAIZZO PA AND MURRAY MJ. 1992. The effects of convective cooling and rewarming on systemic and central nervous system physiology in isoflurane-anesthetized dogs. *Resuscitation* 23: 121-136.
- LARSEN WJ, SCHOENWOLF GC, BLEYL SB, BRAUER PR AND FRANCIS-WEST PH 2009. *Larsen's Human Embryology*. Churchill Livingstone.
- LARSON DM, HAUDENSCHILD CC AND BEYER EC. 1990. Gap junction messenger RNA expression by vascular wall cells. *Circulation Research* 66: 1074-1080.
- LEE S-J, YEOM E, HA H AND NAM K-H. 2011. Cardiac outflow and wall motion in hypothermic chick embryos. *Microvascular research* 82: 296-303.
- LEU M, EHLE E AND PERRIARD J-C. 2001. Characterisation of postnatal growth of the murine heart. *Anatomy and embryology* 204: 217-224.
- LI F, WANG X, CAPASSO JM AND GERDES AM. 1996. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *Journal of molecular and cellular cardiology* 28: 1737-1746.
- LI F, WANG X AND GERDES AM. 1997. Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: II. Cytoskeletal organisation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29: 1553-1565.
- LINHARES VL, ALMEIDA NA, MENEZES DC, ELLIOTT DA, LAI D, BEYER EC, CAMPOS DE CARVALHO AC AND COSTA MW. 2004. Transcriptional regulation of the murine Connexin40 promoter by cardiac factors Nkx2-5, GATA4 and Tbx5. *Cardiovascular research* 64: 402-411.
- LINZBACH A. 1960. Heart failure from the point of view of quantitative anatomy\*. *American Journal of Cardiology* 5: 370-382.
- LYONS I, PARSONS LM, HARTLEY L, LI R, ANDREWS JE, ROBB L AND HARVEY RP. 1995. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes & development* 9: 1654-1666.
- MACKENZIE MA, AENGEVAEREN W, HERMUS A AND KLOPPENBORG P. 1991. Effects of steady hypothermia and normothermia on the electrocardiogram in human poikilothermia. *Arctic medical research* 50: 67-70.
- MANASEK FJ. 1968. Embryonic development of the heart. I. A light and electron microscopic study of myocardial development in the early chick embryo. *Journal of morphology* 125: 329-365.
- MEERSON FZ, ALEKHINA G, ALEKSANDROV P AND BAZARDJAN A. 1968. Dynamics of nucleic acid and protein synthesis of the myocardium in compensatory hyperfunction and hypertrophy of the heart. *American Journal of Cardiology* 22: 337-348.
- MEIJBORG VM, CONRATH CE, OPTHOF T, BELTERMAN CN, DE BAKKER JM AND CORONEL R. 2014. The electrocardiographic T-wave and its relation with ventricular repolarization along major anatomical axes. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology: CIRCEP*. 113.001622.

- MEILHAC SM, ESNER M, KELLY RG, NICOLAS J-F AND BUCKINGHAM ME. 2004a. The clonal origin of myocardial cells in different regions of the embryonic mouse heart. *Developmental cell* 6: 685-698.
- MEILHAC SM, ESNER M, KERSZBERG M, MOSS JE AND BUCKINGHAM ME. 2004b. Oriented clonal cell growth in the developing mouse myocardium underlies cardiac morphogenesis. *The Journal of cell biology* 164: 97-109.
- MERKOW L AND LEIGHTON J. 1966. Increased numbers of annulate lamellae in myocardium of chick embryos incubated at abnormal temperatures. *The Journal of cell biology* 28: 127-137.
- MERKOW L AND LEIGHTON J. 1967. Temperature-induced experimental myocardial hypertrophy in chick embryos. An electron-microscopic and chemical study. *The American journal of pathology* 50: 975.
- MICHELSON A, MACGREGOR H, BARNARD M, KESTIN A, ROHRER M AND VALERI C. 1994. Reversible inhibition of human platelet activation by hypothermia in vivo and in vitro. *Thrombosis and haemostasis* 71: 633-640.
- MIKAWA T 1999. Cardiac lineages. *Heart development: Elsevier*, p. 19-33.
- Seminars in cell & developmental biology, 2007. Elsevier, 90-100 p.
- Development of the Cardiac Conduction System: Novartis Foundation Symposium 250, 2003. Wiley Online Library, 80-109 p.
- MIQUEROL L, MEYSEN S, MANGONI M, BOIS P, VAN RIJEN HV, ABRAN P, JONGSMA H, NARGEOT J AND GROS D. 2004. Architectural and functional asymmetry of the His-Purkinje system of the murine heart. *Cardiovascular research* 63: 77-86.
- MIQUEROL L, MORENO-RASCON N, BEYER S, DUPAYS L, MEILHAC SM, BUCKINGHAM ME, FRANCO D AND KELLY RG. 2010. Biphasic development of the mammalian ventricular conduction system. *Circulation research* 107: 153-161.
- MJAATVEDT CH, YAMAMURA H, WESSELS A, RAMSDELL A, TURNER D AND MARKWALD RR 1999. Mechanisms of segmentation, septation, and remodeling of the tubular heart: endocardial cushion fate and cardiac looping. *Heart development: Elsevier*, p. 159-177.
- MOORMAN A, WEBB S, BROWN NA, LAMERS W AND ANDERSON RH. 2003. Development of the heart:(1) formation of the cardiac chambers and arterial trunks. *Heart* 89: 806-814.
- MORKIN E AND ASHFORD TP. 1968. Myocardial DNA synthesis in experimental cardiac hypertrophy. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 215: 1409-1413.
- MORRIS DL, CHAMBERS HF, MORRIS MG AND SANDE MA. 1985. Hemodynamic characteristics of patients with hypothermia due to occult infection and other causes. *Annals of internal medicine* 102: 153-157.
- MUSIL LS AND GOODENOUGH DA. 1991. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *The Journal of cell biology* 115: 1357-1374.
- MUSIL LS AND GOODENOUGH DA. 1993. Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 74: 1065-1077.
- NAIR K, CUTILLET A, ZAK R, KOIDE T AND RABINOWITZ M. 1968. Biochemical correlates of cardiac hypertrophy: I. Experimental model; changes in heart weight, RNA content, and nuclear RNA polymerase activity. *Circulation Research* 23: 451-462.
- NAKAZAWA M, MIYAGAWA S, TAKAO A, CLARK EB AND HU N. 1986. Hemodynamic effects of environmental hyperthermia in stage 18, 21, and 24 chick embryos. *Pediatric research* 20: 1213.

- NESEMAN M, BUSCH JR H, GUNDERSEN A, GUNDERSEN A AND NEWCOMER K. 1983. Asystolic cardiac arrest in hypothermia. *Wisconsin medical journal* 82: 19-20.
- NIELSEN MS, NYGAARD AXELSEN L, SORGEN PL, VERMA V, DELMAR M AND HOLSTEIN-RATHLOU NH. 2012. Gap junctions. *Comprehensive Physiology*.
- OLIVETTI G, CIGOLA E, MAESTRI R, CORRADI D, LAGRASTA C, GAMBERT SR AND ANVERSA P. 1996. Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 28: 1463-1477.
- OLIVETTI G, RICCI R AND ANVERSA P. 1987. Hyperplasia of myocyte nuclei in long-term cardiac hypertrophy in rats. *The Journal of clinical investigation* 80: 1818-1821.
- ONO N, YAMAGUCHI T, ISHIKAWA H, ARAKAWA M, TAKAHASHI N, SAIKAWA T AND SHIMADA T. 2009. Morphological varieties of the Purkinje fiber network in mammalian hearts, as revealed by light and electron microscopy. *Archives of histology and cytology* 72: 139-149.
- OOSTHOEK P, WENINK AC, VROLIJK BC, WISSE LJ, DERUITER MC, POELMANN RE AND GITTENBERGER-DE GROOT AC. 1998. Development of the atrioventricular valve tension apparatus in the human heart. *Anatomy and embryology* 198: 317-329.
- OOSTHOEK PW, VIRAGH S, MAYEN AE, VAN KEMPEN MJ, LAMERS WH AND MOORMAN AF. 1993. Immunohistochemical delineation of the conduction system. I: The sinoatrial node. *Circulation Research* 73: 473-481.
- OPARIL S, BISHOP SP AND CLUBB FJ. 1984. Myocardial cell hypertrophy or hyperplasia. *Hypertension* 6: III38.
- OSTADAL B 2013. Comparative aspects of cardiac adaptation. *Cardiac Adaptations: Springer*, p. 3-18.
- OVERY HR AND PRIEST RE. 1966. Mitotic cell division in postnatal cardiac growth. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 15: 1100-1103.
- PAFF GH, BOUCEK RJ AND KLOPFENSTEIN HS. 1964. Experimental heart-block in the chick embryo. *The Anatomical Record* 149: 217-223.
- PARK DS AND FISHMAN GI. 2011. The cardiac conduction system. *Circulation* 123: 904-915.
- PATEL R AND KOS L. 2005. Endothelin-1 and Neuregulin-1 convert embryonic cardiomyocytes into cells of the conduction system in the mouse. *Developmental dynamics* 233: 20-28.
- PATON BC. 2001. Cold, casualties, and conquests: the effects of cold on warfare. *Medical aspects of harsh environments* 1: 313-349.
- PATTEN BM, KRAMER TC AND BARRY A. 1948. Valvular action in the embryonic chick heart by localized apposition of endocardial masses. *The Anatomical Record* 102: 299-311.
- PEARSON JC, LEMONS D AND MCGINNIS W. 2005. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nature Reviews Genetics* 6: 893.
- PETERSEN RO AND BASERGA R. 1965. Nucleic acid and protein synthesis in cardiac muscle of growing and adult mice. *Experimental cell research* 40: 340-352.
- PORRELLO ER, WIDDOP RE AND DELBRIDGE L. 2008. Early origins of cardiac hypertrophy: does cardiomyocyte attrition programme for pathological 'catch-up' growth of the heart? *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 35: 1358-1364.
- POUPA O 1993. Heart story: a view to the past. *Heart Function in Health and Disease: Springer*, p. 3-22.

- POUPA O AND OSTADAL B. 1969. Experimental cardiomegalies and “cardiomegalies” in free-living animals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 156: 445-468.
- POZOS RS AND DANZL D. 2001. Human physiological responses to cold stress and hypothermia. *Medical aspects of harsh environments* 1: 351-382.
- POZOS RS AND WITTMERS LE 1983. *The nature and treatment of hypothermia*. University of Minnesota Press.
- PRAKASH O, JONSON B, BOS E, MEIJ S, HUGENHOLTZ PG AND HEKMAN W. 1978. Cardiorespiratory and metabolic effects of profound hypothermia. *Critical care medicine* 6: 340-346.
- RECKOVA M, ROSENGARTEN C, STANLEY CP, WESSELS A, GOURDIE RG, THOMPSON RP AND SEDMERA D. 2003. Hemodynamics is a key epigenetic factor in development of the cardiac conduction system. *Circulation research* 93: 77-85.
- RENTSCHLER S, ZANDER J, MEYERS K, FRANCE D, LEVINE R, PORTER G, RIVKEES SA, MORLEY GE AND FISHMAN GI. 2002. Neuregulin-1 promotes formation of the murine cardiac conduction system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 10464-10469.
- SÁEZ JC, BERTHOUD VM, BRANES MC, MARTINEZ AD AND BEYER EC. 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiological reviews* 83: 1359-1400.
- SANDERS E, DE GROOT I, GEERTS W, DE JONG F, VAN HORSSSEN A, LOS J AND MOORMAN A. 1986. The local expression of adult chicken heart myosins during development. *Anatomy and embryology* 174: 187-193.
- SANDRITTER W AND SCOMAZZONI G. 1964. Deoxyribonucleic acid content (Feulgen photometry) and dry weight (interference microscopy) of normal and hypertrophic heart muscle fibres. *Nature* 202: 100.
- SANKOVA B, BENES JR J, KREJCI E, DUPAYS L, THEVENIAU-RUISSY M, MIQUEROL L AND SEDMERA D. 2012. The effect of connexin40 deficiency on ventricular conduction system function during development. *Cardiovascular research* 95: 469-479.
- SAVOLAINEN SM, FOLEY JF AND ELMORE SA. 2009. Histology atlas of the developing mouse heart with emphasis on E11. 5 to E18. 5. *Toxicologic pathology* 37: 395-414.
- SEARCY RD, VINCENT EB, LIBERATORE CM AND YUTZEY KE. 1998. A GATA-dependent nkx-2.5 regulatory element activates early cardiac gene expression in transgenic mice. *Development* 125: 4461-4470.
- SEDMERA D. 2011. Function and form in the developing cardiovascular system. *Cardiovascular research* 91: 252-259.
- SEDMERA D AND GOURDIE R. 2014. Why do we have Purkinje fibers deep in our heart? *Physiological research* 63: S9.
- SEDMERA D, PEXIEDER T, HU N AND CLARCK E. 1998. A quantitative study of the ventricular myoarchitecture in the stage 21-29 chick embryo following decreased loading. *European journal of morphology* 36: 105-119.
- SEDMERA D, PEXIEDER T, HU N AND CLARK EB. 1997. Developmental changes in the myocardial architecture of the chick. *The Anatomical Record* 248: 421-432.
- SEDMERA D, PEXIEDER T, VUILLEMIN M, THOMPSON RP AND ANDERSON RH. 2000. Developmental patterning of the myocardium. *The Anatomical Record* 258: 319-337.
- SEDMERA D, RECKOVA M, BIGELOW MR, DEALMEIDA A, STANLEY CP, MIKAWA T, GOURDIE RG AND THOMPSON RP. 2004. Developmental transitions in electrical activation patterns in chick embryonic heart. *The Anatomical Record* 280: 1001-1009.

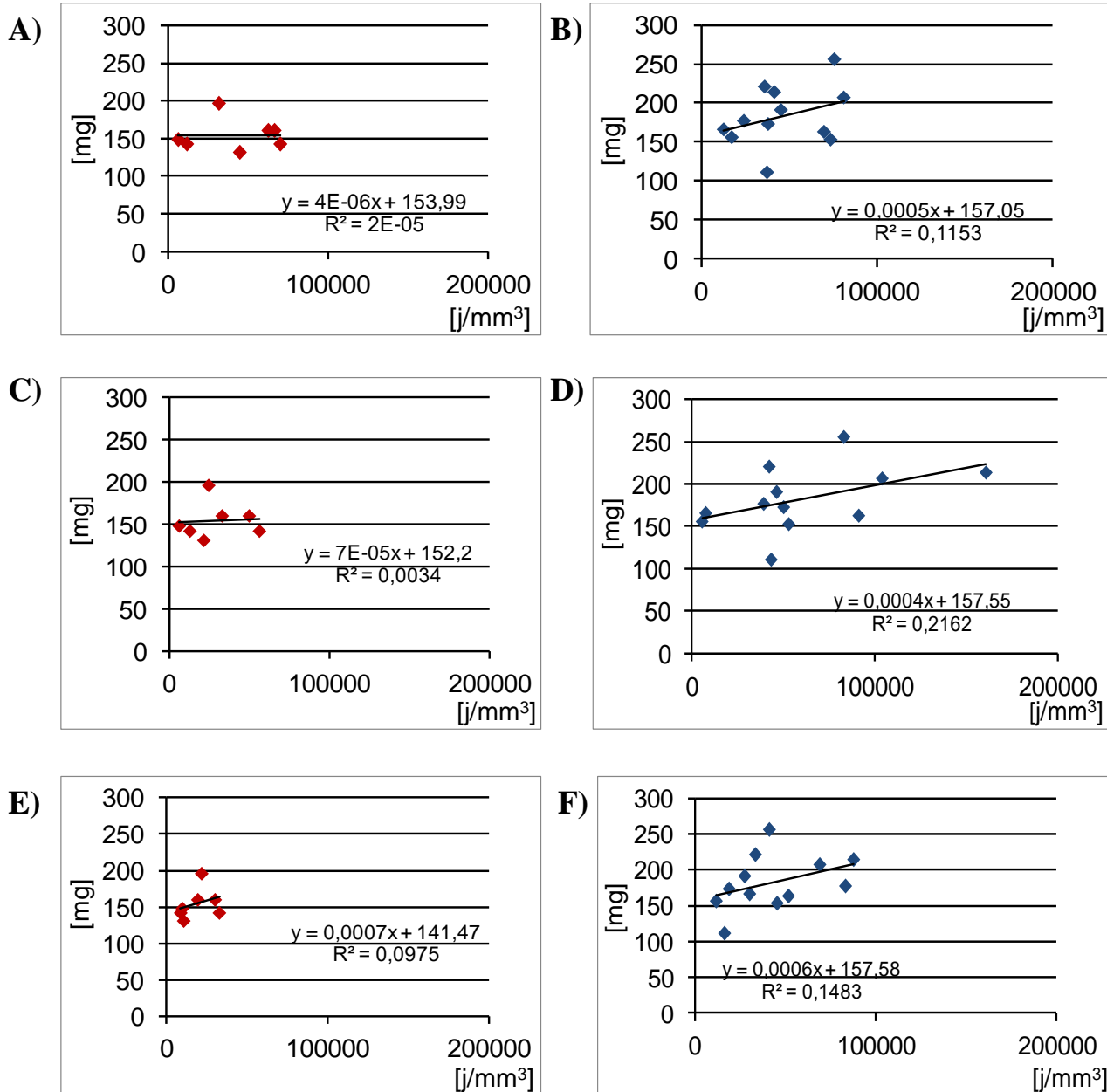
- SEDMERA D, RECKOVA M, DEALMEIDA A, SEDMEROVA M, BIERMANN M, VOLEJNIK J, SARRE A, RADDATZ E, MCCARTHY RA AND GOURDIE RG. 2003a. Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in zebrafish and *Xenopus* hearts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 284: H1152-H1160.
- SEDMERA D AND THOMPSON RP. 2011. Myocyte proliferation in the developing heart. *Developmental Dynamics* 240: 1322-1334.
- SEDMERA D, THOMPSON RP AND KOLAR F. 2003b. Effect of increased pressure loading on heart growth in neonatal rats. *Journal of molecular and cellular cardiology* 35: 301-309.
- SEGERS M, DIEPHUIS J, VAN KESTEREN R AND VAN DER WERKEN C. 1998. Hypothermie bei Traumapatienten. *Der Unfallchirurg* 101: 742-749.
- SESSLER DI, ISRAEL D, POZOS RS, POZOS M AND RUBINSTEIN EH. 1988. Spontaneous post-anesthetic tremor does not resemble thermoregulatory shivering. *Anesthesiology* 68: 843-850.
- SEVERS N. 1990. The cardiac gap junction and intercalated disc. *International journal of cardiology* 26: 137-173.
- SEVERS NJ, BRUCE AF, DUPONT E AND ROTHERY S. 2008. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovascular research* 80: 9-19.
- SEVERS NJ, COPPEN SR, DUPONT E, YEH H-I, KO Y-S AND MATSUSHITA T. 2004. Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovascular research* 62: 368-377.
- SHAFIQ S, GORYCKI M AND MAURO A. 1968. Mitosis during postnatal growth in skeletal and cardiac muscle of the rat. *Journal of anatomy* 103: 135.
- SHIOJIMA I, KOMURO I, OKA T, HIROI Y, MIZUNO T, TAKIMOTO E, MONZEN K, AIKAWA R, AKAZAWA H AND YAMAZAKI T. 1999. Context-dependent transcriptional cooperation mediated by cardiac transcription factors *Csx/Nkx-2.5* and *GATA-4*. *Journal of Biological Chemistry* 274: 8231-8239.
- SILBERNAGL S AND DESPOPOULOS A 2004. Atlas fyziologie člověka. Grada Publishing, spol. sro.
- SMOLICH JJ, WALKER AM, CAMPBELL GR AND ADAMSON TM. 1989. Left and right ventricular myocardial morphometry in fetal, neonatal, and adult sheep. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 257: H1-H9.
- SÖHL G AND WILLECKE K. 2004. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular research* 62: 228-232.
- SOMERVILLE W. 1960. The Effect of hypothermia on atrial fibrillation and other arrhythmias. *British heart journal* 22: 515.
- SOMMER JR AND JOHNSON EA. 1968. Cardiac muscle: a comparative study of Purkinje fibers and ventricular fibers. *The Journal of cell biology* 36: 497-526.
- SPURR G AND BARLOW G. 1959. Influence of prolonged hypothermia and hyperthermia on myocardial sodium, potassium and chloride. *Circulation research* 7: 210-218.
- STACY V, DE MATTEO R, BREW N, SOZO F, PROBYN ME, HARDING R AND BLACK MJ. 2009. The influence of naturally occurring differences in birthweight on ventricular cardiomyocyte number in sheep. *The Anatomical Record* 292: 29-37.
- SUMA K. 2001. Sunao Tawara: a father of modern cardiology. *Pacing and Clinical Electrophysiology* 24: 88-96.
- SWAN H, ZEAVIN I, HOLMES JH AND MONTGOMERY V. 1953. Cessation of circulation in general hypothermia I. Physiologic changes and their control. *Annals of surgery* 138: 360.



- ŠOLC D. 2007. The heart and heart conducting system in the kingdom of animals: A comparative approach to its evolution. *Experimental & Clinical Cardiology* 12: 113.
- TAWARA S. 1906. Das reizleitungssystem des Säugetierherzens. Fischer.
- THERMINARIAS A AND PELLEREI E. 1987. Plasma catecholamine and metabolic changes during cooling and rewarming in dogs. *Experimental biology* 47: 117-123.
- TOBITA K AND KELLER BB. 2000. Right and left ventricular wall deformation patterns in normal and left heart hypoplasia chick embryos. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 279: H959-H969.
- TRANUM-JENSEN J, WILDE AA, VERMEULEN JT AND JANSE MJ. 1991. Morphology of electrophysiologically identified junctions between Purkinje fibers and ventricular muscle in rabbit and pig hearts. *Circulation Research* 69: 429-437.
- TROJAN S 2003. Lékařská fyziologie. Grada Publishing as.
- UNGER VM, KUMAR NM, GILULA NB AND YEAGER M. 1999. Three-dimensional structure of a recombinant gap junction membrane channel. *Science* 283: 1176-1180.
- VAN DEN BERG G, ABU-ISSA R, DE BOER BA, HUTSON MR, DE BOER PA, SOUFAN AT, RUIJTER JM, KIRBY ML, VAN DEN HOFF MJ AND MOORMAN AF. 2009. A caudal proliferating growth center contributes to both poles of the forming heart tube. *Circulation research* 104: 179-188.
- VEENSTRA R, WANG H, WESTPHALE E AND BEYER E. 1992. Multiple connexins confer distinct regulatory and conductance properties of gap junctions in developing heart. *Circulation Research* 71: 1277-1283.
- VERHEIJCK EE, VAN KEMPEN MJ, VEERESCHILD M, LURVINK J, JONGSMA HJ AND BOUMAN LN. 2001. Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovascular research* 52: 40-50.
- VIGMOND EJ AND STUYVERS BD. 2016. Modeling our understanding of the His-Purkinje system. *Progress in biophysics and molecular biology* 120: 179-188.
- VIRAGH S AND CHALLICE C. 1983. The development of the early atrioventricular conduction system in the embryonic heart. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 61: 775-792.
- VITADELLO M, COLPO P AND GORZA L. 1998. Rabbit cardiac and skeletal myocytes differ in constitutive and inducible expression of the glucose-regulated protein GRP94. *Biochemical Journal* 332: 351.
- VOSTAREK F, SANKOVA B AND SEDMERA D. 2014. Studying dynamic events in the developing myocardium. *Progress in biophysics and molecular biology* 115: 261-269.
- VOSTAREK F, SVATUNKOVA J AND SEDMERA D. 2016. Acute temperature effects on function of the chick embryonic heart. *Acta Physiologica* 217: 276-286.
- VUILLEMIN M AND PEXIEDER T. 1989. Normal stages of cardiac organogenesis in the mouse: II. Development of the internal relief of the heart. *Developmental Dynamics* 184: 114-128.
- WARBANOW W. 1970. Morphologic and functional studies of the hypothermia-induced hypertrophy of the embryonic chick heart. *Acta biologica et medica Germanica* 25: 281.
- WARBANOW W. 1971. Contractility of the embryonic chick heart in hypothermia-induced cardiac hyperplasia and hypertrophy. *Acta biologica et medica Germanica* 26: 859.

- WEGNER G AND MÖLBERT E. 1966. Das Verhalten des Myokards bei der experimentellen supralvalvulären Aortenstenose. Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin 341: 54-63.
- WIDDOWSON E, CRABB D AND MILNER R. 1972. Cellular development of some human organs before birth. Archives of Disease in Childhood 47: 652-655.
- WILLS AA, HOLDWAY JE, MAJOR RJ AND POSS KD. 2008. Regulated addition of new myocardial and epicardial cells fosters homeostatic cardiac growth and maintenance in adult zebrafish. Development 135: 183-192.
- WITTIG JG AND MÜNSTERBERG A. 2016. The early stages of heart development: insights from chicken embryos. Journal of cardiovascular development and disease 3: 12.
- WONG K. 1983. Physiology and pharmacology of hypothermia. Western Journal of Medicine 138: 227.
- YOST HJ. 1995. Vertebrate left-right development. Cell 82: 689-692.

## 8 Přílohy



**Graf 14: Korelace mezi jednotlivými oblastmi a hmotností srdce.**

*A) Cirkulární vrstva v levé komoře proti hmotnosti srdce u normotermie. B) Cirkulární zóna v levé komoře proti hmotnosti u hypotermie. C) Papilární svaly levé komory proti hmotnosti srdce u normotermie. D) Papilární svaly levé komory vůči hmotnosti srdce u hypotermie. E) Cirkulární vrstva pravé komory proti váze srdce u normotermie. F) Cirkulární oblast pravé komory proti hmotnosti srdce u hypotermie.*

## Značení $\alpha$ SA + WGA + Hoechst

1. Odparafinování
2. Rehydratace
3. *Praní*

1x	PBS	<i>5 minut</i>
2x	PBS – Tween 20 (0,5%)	<i>2x5 minut</i>
2x	PBS	<i>2x5 minut</i>
4. **Předinkubace** NGS 1:10 / 1% BSA / 0,1% PBT      RT      20-60 minut
5. **Inkubace s 1. AB:**      +4°C      ON
  - **$\alpha$ SA** (Sigma A2172) **1:800**  
ředit v NGS 1:10 / 1% BSA / 0,1% PBT
6. *Praní*      3x PBS      *3x10 minut*
7. **Inkubace s 2. AB:**      RT      90 minut-4 hodiny
  - **Goat anti Mouse – TRITC** (JIRL 115-025-068) **1:200**  
ředit v NGS 1:10 / 1% BSA / 0,1% PBT
8. *Praní*      3x PBS      *3x10 minut*
9. **Aplikace lektinu:**      RT      60 minut
  - **WGA – Alexa 488** (Invitrogen W11261) **1:50**  
ředit v 1% BSA / 0,1% PBT
10. *Praní*

3x	PBS	<i>3x5 minut</i>
1x	destil. H <sub>2</sub> O	<i>1x5 minut</i>
11. **HOECHST** (Sigma 861405) **1:100 000**      RT      10 minut  
ředit v 0,1% Triton / destil. H<sub>2</sub>O
12. *Praní*      2x destil. H<sub>2</sub>O      *2x5 minut*
13. Odvodnění
14. Montáž do Depexu

**Laboratoř molekulární embryologie prof. Sedmery**  
 Anatomický ústav  
 1. lékařská fakulta  
 Univerzita Karlova

## Značení phospho-Histone H3 (pHIS 3) + DRAQ 5

15. Odparafinování

16. Rehydratace

<b>17. Praní</b>	1x PBS	<i>5 minut</i>
	2x PBS – Tween 20 (0,5%)	<i>2x5 minut</i>
	2x PBS	<i>2x5 minut</i>

18. Restaurace antigenu v 10mM citrátovém pufru pH 6,00 (MW 750 W) 2x5 minut

19. Chladnutí v PBS – Triton 0,1% 10 minut

20. Praní 2x PBS 2x5 minut

21. Předinkubace NGS 1:10 / 0,1% PBT RT 20-60 minut

22. Inkubace s 1. AB: +4°C ON

- pHIS 3 (Millipore 06-570) 1:100
- ředit v NGS 1:10 / 0,1% PBT

23. Praní 3x PBS 3x10 minut

24. Inkubace s 2. AB: RT 90 minut-4 hodiny

- Goat anti Rabbit–Alexa 488 (ab150097) 1:200
- ředit v NGS 1:10 / 0,1% PBT

<b>25. Praní</b>	3x PBS	<i>3x5 minut</i>
	1x destil. H <sub>2</sub> O	<i>1x5 minut</i>

26. DRAQ 5 (LI-COR 928-40022) 1:1000 RT 60 minut

ředit v 0,1% PBT

<b>27. Praní</b>	2x PBS	<i>2x5 minut</i>
	1x destil. H <sub>2</sub> O	<i>1x5 minut</i>

28. Odvodnění

29. Montáž do Depexu

**Laboratoř molekulární embryologie prof. Sedmery**

Anatomický ústav

1. lékařská fakulta

Univerzita Karlova